



**Charakterisierung humaner Cytochrom-P450-Enzyme
in transplastomen Tabakpflanzen
am Beispiel des CYP2A6**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. Susan Urbank

aus

Bautzen

Berichterstatter: Prof. Dr. Heribert Warzecha

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 09.03.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2012

Darmstadt 2012

D17

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1. Einleitung | 9 |
| 1.1 Indigo | 9 |
| 1.1.1 Biosynthese der Indigo-Vorstufen | 9 |
| 1.1.2 Indigosynthese durch rekombinante Bakterienstämme | 11 |
| 1.2 Cytochrom-P450-Enzyme | 12 |
| 1.2.1 Allgemeine Charakteristika | 12 |
| 1.2.2 Struktur und Reaktionsmechanismus | 13 |
| 1.2.3 Humane Cytochrom-P450-Enzyme | 15 |
| 1.2.3.1 CYP2A6 | 16 |
| 1.3 Cytochrom-P450-NADPH-Reduktasen | 17 |
| 1.3.1 Cytochrom-P450-NADPH-Reduktase ATR2 | 18 |
| 1.4 Biosynthese indigoider Vorstufen durch Expression des humanen CYP2A6 | 19 |
| 1.4.1 Expression von CYP2A6 in <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 1.4.2 Stabile Kernexpression des humanen CYP2A6 in <i>Nicotiana tabacum</i> | 20 |
| 1.5 Proteinsynthese nach Transformation des Chloroplastengenoms | 22 |
| 1.6 Fragestellung | 22 |
| 2. Material | 25 |
| 2.1 Laborgeräte | 25 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 26 |
| 2.3 Chemikalien | 26 |
| 2.4 Enzyme | 27 |
| 2.5 Pufferlösungen | 28 |
| 2.6 Antikörper | 28 |
| 2.7 Kulturmedien | 28 |
| 2.8 Bakterienstämme | 29 |
| 2.9 Pflanzenmaterial | 30 |
| 2.10 Primer | 30 |
| 2.11 Genmaterial | 31 |
| 2.12 Vektoren | 31 |
| 2.13 Molekularbiologische Kits | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Methoden | 34 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 3.1.1 Extraktion von RNA aus Pflanzenzellen | 34 |
| 3.1.2 Extraktion von pflanzlicher DNA | 34 |
| 3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien | 35 |
| 3.1.4 Restriktionsverdau | 36 |
| 3.1.4.1 Partieller Restriktionsverdau | 36 |
| 3.1.5 Ligation | 37 |
| 3.1.6 Auftrennung von Nukleinsäuren | 37 |
| 3.1.6.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA | 37 |
| 3.1.6.2 Denaturierende Adarosegele zur Auftrennung von RNA | 37 |
| 3.1.7 DNA-Elution aus Agarosegelen | 38 |
| 3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen | 38 |
| 3.1.9 Transformation kompetenter Bakterienzellen | 39 |
| 3.1.10 Herstellung kompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen | 39 |
| 3.1.11 Transformation kompetenter <i>A. tumefaciens</i> Zellen | 40 |
| 3.1.12 Polymerase-Ketten-Reaktion | 40 |
| 3.1.12.1 Colony-Screening | 41 |
| 3.1.12.2 Herstellung DIG-dUTP markierter Sonden | 41 |
| 3.1.13 Transfertechniken | 42 |
| 3.1.13.1 Northern Blot | 42 |
| 3.1.13.2 Southern Blot | 44 |
| 3.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA | 44 |
| 3.1.15 Fertigung von Glycerolstocks | 45 |
| 3.2 Isolierung intakter Chloroplasten | 45 |
| 3.3 Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten | 46 |
| 3.4 Proteinbiochemische Methoden | 47 |
| 3.4.1 Proteinisolierung aus Pflanzenmaterial | 47 |
| 3.4.2 Proteinisolierung aus Bakterien | 47 |
| 3.4.2.1 Membranproteinisolierung aus Bakterien | 48 |
| 3.4.3 SDS-PAGE | 49 |
| 3.4.4 Western Blot | 50 |
| 3.4.5 Färbung von SDS-Gelen | 51 |
| 3.5 Inkorporation von [9,10- ³ H] Palmitinsäure | 51 |
| 3.5.1 Vorbereitung der [9,10- ³ H] Palmitinsäure | 51 |
| 3.5.2 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung stoffwechselaktiver Protoplasten | 52 |
| 3.5.3 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung bakterieller Zellen | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6 Transformation von Pflanzen | 53 |
| 3.6.1 Chloroplastentransformation von <i>Nicotiana tabacum</i> | 53 |
| 3.6.2 Kerntransformation von <i>Nicotiana tabacum</i> | 54 |
| 3.6.3 Transiente Expression | 55 |
| 3.7 Kultivierung von Pflanzen | 56 |
| 3.8 Dünnschichtchromatographie | 56 |
| 3.9 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie | 57 |
| 4. Ergebnisse | 58 |
| 4.1 Expression des humanen CYP2A6 im Chloroplastengenom | 58 |
| 4.1.1 Charakterisierung homoplastischer pNT2-2A6-Linien | 58 |
| 4.1.1.1 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese | 58 |
| 4.1.1.2 Aktivitätsnachweis des Proteins CYP2A6 | 60 |
| 4.1.1.3 Aktivitätsnachweis des Proteins CYP2A6 nach Indol-Zugabe | 61 |
| 4.1.1.4 Einfluss des Pflanzenalters auf die Transkriptionsrate | 63 |
| 4.1.2 Charakterisierung homoplastischer pNT2-2A6-hNPR-Linien | 64 |
| 4.1.2.1 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese | 64 |
| 4.1.3 Charakterisierung homoplastischer p2A6-4441-Linien | 66 |
| 4.1.3.1 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese | 66 |
| 4.1.3.2 Aktivitätsnachweis von CYP2A6 nach Indol-Zugabe | 68 |
| 4.1.3.3 Einfluss des Pflanzenalters auf die Transkriptionsrate | 69 |
| 4.2 Optimierung des Expressionssystems | 70 |
| 4.2.1 Klonierung des optimierten Gens <i>2A6opt</i> | 73 |
| 4.2.2 Stabile Chloroplastentransformation | 75 |
| 4.2.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen | 75 |
| 4.2.4 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese | 77 |
| 4.3 Erzeugung transplastomer pBX1-p2A6opt-4701-Linien | 79 |
| 4.3.1 pBX1-Linien | 79 |
| 4.3.2 Stabile Chloroplastentransformation | 79 |
| 4.3.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen | 80 |
| 4.3.4 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese | 80 |
| 4.3.5 Aktivitätsnachweis von CYP2A6 | 81 |
| 4.4 Charakterisierung der <i>Arabidopsis thaliana</i> NADPH-Reduktase ATR2 | 83 |
| 4.4.1 Klonierung der Reduktase ATR2 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 84 |
| 4.4.2 Bakterielle Expression der Reduktase ATR2 | 85 |
| 4.5 Charakterisierung der NADPH-Reduktase ATR2 durch Expression des N-terminalen 5'-Sequenzabschnittes | 87 |

| | |
|--|------------|
| 4.5.1 Klonierung der 5`ATR2- und 5`ATR2mut-Varianten | 87 |
| 4.5.2 Klonierung und bakterielle Expression der 5`ATR2/5`ATR2mut-Varianten | 90 |
| 4.5.3 Untersuchungen zur Lipidmodifikation | 93 |
| 4.5.3.1 Membranproteinfraktionierung | 93 |
| 4.5.3.2 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung | 95 |
| 4.5.4 Klonierung und transiente Expression der 5`ATR2/5`ATR2mut-Varianten | 96 |
| 4.5.5 Identifizierung transgener Pflanzen | 99 |
| 4.5.6 Untersuchungen zur Lokalisation der 5`ATR2/5`ATR2mut-Varianten | 101 |
| 4.5.6.1 Isolierung intakter Chloroplasten | 101 |
| 4.5.6.2 Isolierung von Protoplasten | 102 |
| 4.5.6.3 Mikroskopische Bildgebung mittels CLSM | 104 |
| 4.5.7 Untersuchungen zur Lipidmodifikation der 5`ATR2/5`ATR2mut –Varianten | 107 |
| 4.5.7.1 <i>In vivo</i> -Isotopenmarkierung | 107 |
| 5. Diskussion | 109 |
| 5.1 Charakterisierung homoplastischer CYP2A6-Linien | 109 |
| 5.2 Optimierung des Expressionssystems | 114 |
| 5.3 Substratinhibition durch Nikotin | 117 |
| 5.4 Charakterisierung der NADPH-Reduktase ATR2 | 118 |
| 5.4.1 Lipidierung und Lokalisation von ATR2 in Bakterienzellen | 119 |
| 5.4.2 Lipidierung und Lokalisation von ATR2 nach transienter Expression | 122 |
| 5.5 Fazit | 126 |
| 6. Zusammenfassung | 127 |
| 7. Summary | 129 |
| 8. Literaturverzeichnis | 131 |
| 9. Anhang | 148 |
| Danksagung | 156 |
| Lebenslauf | 157 |
| Erklärung | 158 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|---------------------|---|---|
| <i>aadA</i> | - | Aminoglycosid-3-Adenyltransferase |
| APS | - | Ammoniumpersulfat |
| ATR1 | - | <i>Arabidopsis thaliana</i> NADPH-Reduktase 1 |
| ATR2 | - | <i>Arabidopsis thaliana</i> NADPH-Reduktase 2 |
| bp | - | Basenpaare |
| cDNA | - | complementary DNA |
| CLSM | - | Confocal Laser Scanning Microscopy |
| CYP | - | Cytochrom-P450-Enzym |
| DC | - | Dünnschichtchromatographie |
| dd H ₂ O | - | Doppelt destilliertes Wasser |
| DIG-dUTP | - | Digoxigenin-Desoxyuridintriphosphat |
| dNTPs | - | Desoxyribonucleotide |
| DNA | - | Desoxyribonucleinsäure |
| EDTA | - | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | - | Endoplasmatisches Retikulum |
| EtOH | - | Ethanol |
| FA | - | Formaldehyd |
| g | - | Gramm |
| h | - | Stunde |
| HCl | - | Salzsäure |
| hNPR | - | humane NADPH-Reduktase |
| IPTG | - | Isopropylthiogalactosid |
| kb | - | Kilobasen |
| kDa | - | Kilo-Dalton |
| l | - | Liter |
| LB-Medium | - | Luria-Bertani-Medium |
| M | - | molar |
| MCS | - | multiple cloning site |
| MeOH | - | Methanol |
| min | - | Minute |
| mM | - | millimolar |
| MOPS | - | 3-Morpholino-propan-sulfonsäure |
| M _R | - | relative Molekülmasse |
| mRNA | - | messenger RNA |
| MS-Salze | - | Murashige & Skoog Salze |

| | | |
|--------------|---|---|
| NADPH | - | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat |
| nm | - | Nanometer |
| <i>nptII</i> | - | Neomycinphosphotransferase II |
| OD | - | optische Dichte |
| PBS | - | Phosphatpuffer |
| PCR | - | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | - | Polyethylenglycol |
| <i>Prrn</i> | - | 16S rRNA Promotor |
| <i>psbA</i> | - | Gen des D1-Proteins |
| <i>rbcL</i> | - | Ribulosebisphosphatcarboxylase |
| RBS | - | Ribosomenbindestelle |
| RFLP | - | Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus |
| RNA | - | Ribonucleinsäure |
| rpm | - | rounds per minute |
| RT | - | Raumtemperatur |
| SDS-Page | - | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SDS | - | Natriumdodecylsulfat |
| sec | - | Sekunde |
| TAE | - | Tris-Acetat-EDTA |
| <i>Taq</i> | - | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TEMED | - | N,N,N',N'-Tetramethylenaminomethan |
| U | - | Unit |
| UTR | - | Untranslatierte Region |
| V | - | Volumen oder Volt |
| v/v | - | Volumen pro Volumen |
| WT | - | Wildtyp |

1. Einleitung

1.1 Indigo

Schon seit über 4600 Jahren ist die Substanz Indigo bekannt und wird auch heute noch zum Färben von Textilien jeglicher Art genutzt (Gilbert & Cooke, 2001). Bevor der blaue Farbstoff synthetisch hergestellt werden konnte, dienten ausschließlich Pflanzen der unterschiedlichsten Familien als Quelle zur Gewinnung des Farbstoffes (Gillam *et al.*, 2000). Vor allem die in tropischen und subtropischen Gebieten beheimateten *Indigofera*-Arten (Fabaceae) wurden wegen ihres hohen Gehaltes an farbgebenden Pigmenten großflächig angebaut (Leake, 1975). Desweiteren kann Indigo zum Beispiel aus dem europäischen Färberwaid, *Isatis tinctorium* (Brassicaceae), aus *Isatis indigotica* (Brassicaceae) oder aus *Polygonum tinctorium* (Polygonaceae) gewonnen werden (Maugard *et al.*, 2001). Gegen Ende des 19. Jahrhunderts gelang es Adolf von Bayer, Indigo zum ersten Mal synthetisch aus Phenyllessigsäure herzustellen. Siebzehn Jahre später wurde durch die Badische Anilin- und Sodafabrik (BASF) der erste synthetische Indigo auf den Markt gebracht, der auch bis heute noch Verwendung findet (Xia & Zenk, 1992).

1.1.1 Biosynthese der Indigo-Vorstufen

Der aus den Färbepflanzen gewonnene blaue Farbstoff Indigo ist nicht direkt ein natürliches pflanzliches Produkt, sondern entsteht aus mehreren Vorstufen und wird letztendlich durch Verletzung der Pflanze oder durch Fermentationsprozesse freigesetzt (Gilbert & Cooke, 2000). Eine der wichtigsten Vorstufen ist das farblose Glykosid Indican (Indoxyl-3-O- β -D-Glucosid, welches als Sekundärmetabolit in den Vakuolen der Blätter akkumuliert (Angelini *et al.*, 2004). Isatan B (Indoxyl-5-Ketogluconat), das vor allem in Blättern von *Isatis tinctoria* vorkommt, wird ebenfalls als Vorstufe in den Vakuolen gespeichert (Kokubun *et al.*, 1998; Oberthür *et al.*, 2004). Bei Verletzung der Pflanze werden Indican und Isatan B aus der Vakuole freigesetzt, endogene β -Glucosidasen spalten den Zuckerrest ab und das sehr reaktive Indoxyl entsteht. Durch spontane Oxidation können nun zwei Moleküle Indoxyl zu einem stabilen Produkt dimerisieren, dem blauen Farbstoff Indigo (Maugard *et al.*, 2002) (Abbildung 1.1).

Die Synthese von Indican bzw. Indoxyl ist bisher noch nicht im Detail aufgeklärt, vor allem die an diesem Reaktionsweg beteiligten Enzyme sind weitgehend unbekannt. Die wichtige Vorstufe des Indican, das Indol, entsteht als ein Zwischenprodukt während des Shikimisäurewegs. Zunächst synthetisiert die Pflanze, katalysiert durch eine IGP-Synthase, Indol-3-Glycerolphosphat (IGP; (1)), das als Zwischenprodukt während der Biosynthese von

Chorismat zu Tryptophan entsteht. Indol-3-Glycerolphosphat wird dann mittels der α -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSA) zu Indol (2) metabolisiert (Important Rare Plant Pigments). Zu diesem Zeitpunkt entsteht allerdings kein freies Indol, da die β -Untereinheit der Tryptophansynthase (TSB) das gebildete Indol sofort zu Tryptophan (3) umwandelt (Radwanski *et al.*, 1995). Da gezeigt werden konnte, dass Tryptophan kein Vorläufer von Indoxyl ist (Xia & Zenk, 1992), lässt dies darauf schließen, dass ein Enzym existiert, das freies Indol bilden kann. Ein solches Enzym konnte bereits aus der Maispflanze isoliert und charakterisiert werden. Das als BX1 benannte, Tryptophansynthase α -ähnliche Enzym ist in der Lage, freies Indol aus IGP zu bilden (Frey *et al.*, 2000; Kulik *et al.*, 2005). Diese Untersuchungen bestätigen die Vermutung, dass auch in den Färbepflanzen derartige Enzyme vorhanden sein müssen.

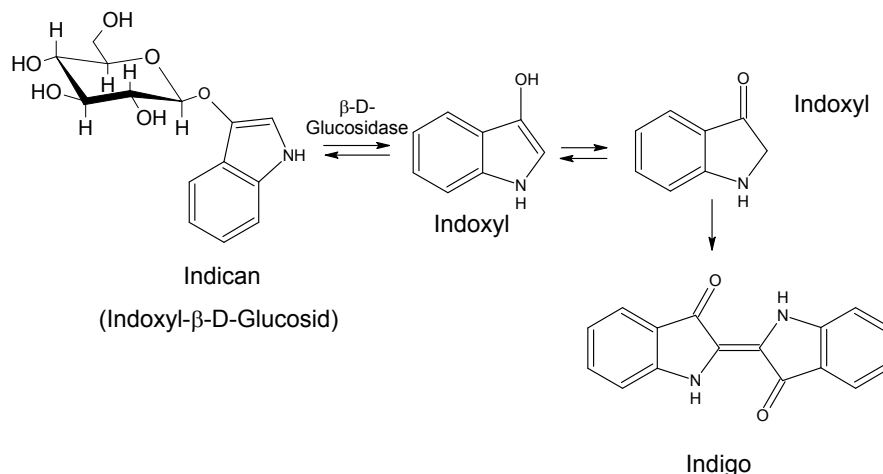


Abbildung 1.1. Enzymatische Bildung von Indigo. Zwei Moleküle Indoxyl, die durch Abspaltung von Zucker aus Indican entstanden sind, dimerisieren durch spontane Oxidation zu Indigo

Das gebildete Indol wird dann durch ein bisher unbekanntes Enzym hydroxyliert, sodass das sehr reaktive Indoxyl (4) entsteht (Abbildung 1.2). Der letzte Schritt dieser Biosynthese besteht aus dem Anheften eines aktivierten Glucosemoleküls (UDP-Glucose) an Indoxyl, katalysiert durch eine Indicansynthase, und das so entstandene Indican (5) kann dann in der Vakuole gespeichert werden (Gillam *et al.*, 2000; Minami *et al.*, 2000; Abbildung 1.2).

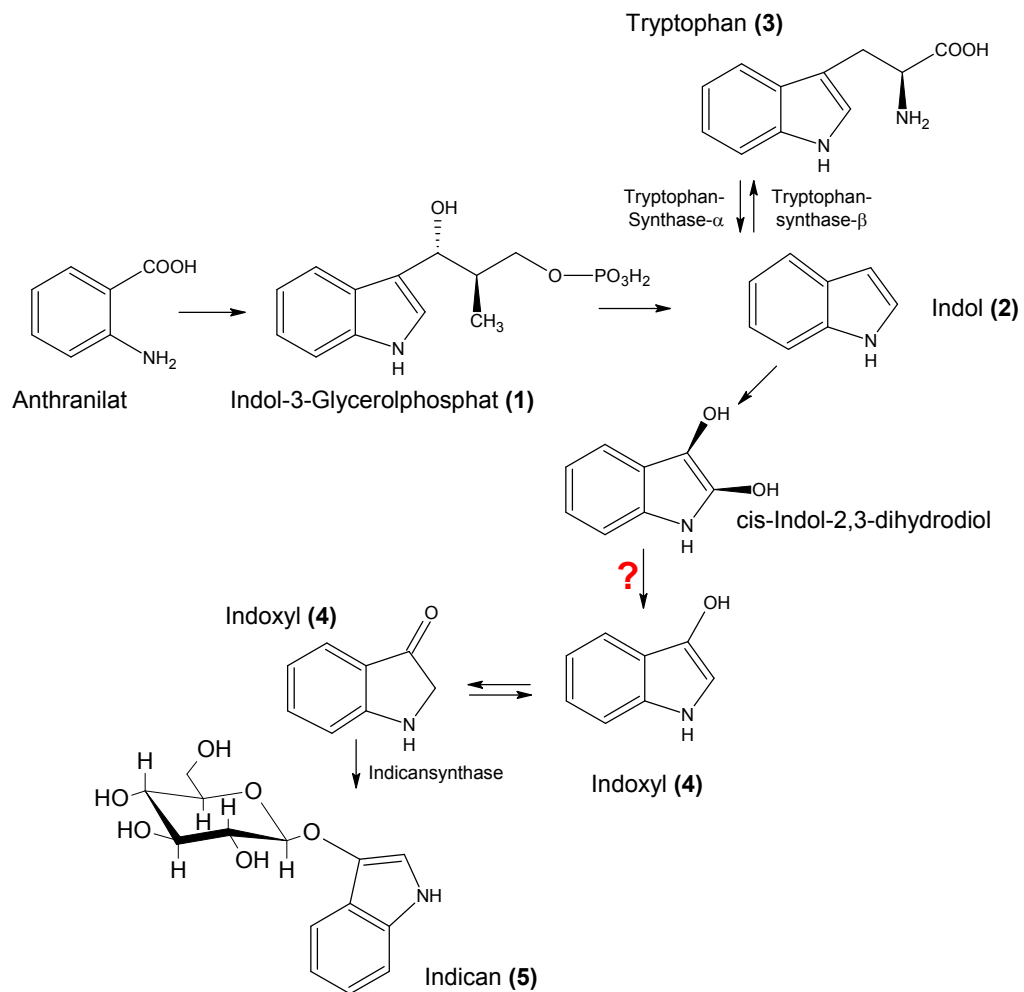


Abbildung 1.2. Biosyntheseweg der Indigo-Vorstufe Indican. Ausgehend von Indol-3-Glycerolphosphat (1) entsteht Indol (2) als intermediäres Produkt bei der Bildung von Tryptophan (3). Indol wird dann durch ein bisher unbekanntes Enzym zu Indoxyl (4) hydroxyliert und als Glucosid Indican (5) gespeichert.

1.1.2 Indigosynthese durch rekombinante Bakterienstämme

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, konnte das für die Hydroxylierung von Indol verantwortliche Enzym aus Pflanzen bisher nicht identifiziert werden. Aus anderen Organismen sind allerdings Enzyme beschrieben, die Indol hydroxylieren und somit zur Bildung von Indigo führen.

Ein solches Enzym ist zum Beispiel die Naphtalen-Dioxygenase. Das aus *Pseudomonas putida* stammende Enzym, welches normalerweise Naphtalen zu Salicylsäure metabolisiert, war ebenso in der Lage Indol zu hydroxylieren (Ensley *et al.*, 1983). Ebenso ist es gelungen, rekombinante *E. coli* Stämme herzustellen, die zu einer erhöhten Indigoproduktion fähig sind. Diese rekombinanten Stämme enthielten ein modifiziertes Tryptophan-Operon, das heißt eine Mutation im Gen der β -Untereinheit der Tryptophansynthase, sodass Indol nicht mehr zu Tryptophan metabolisiert werden kann und in hoher Konzentration zur Verfügung steht. Desweiteren exprimierten diese Stämme Gene, die für die vier Untereinheiten der Naphtalen-Dioxygenase kodieren. Wurden die rekombinanten Bakterienstämme in Glucose-haltigem Medium kultiviert, konnte nach einiger Zeit die Bildung von Indigo beobachtet werden (Murdoch *et al.*, 1993; Berry *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel für ein bakterielles, Indol-hydroxylierendes Enzym ist eine Haloperoxidase, die zuerst aus *Pseudomonas pyrrocinia* isoliert werden konnte. Zusätzlich zur halogenierenden Aktivität konnte auch dieses Enzym Indol und Indolderivate hydroxylieren (Burd *et al.*, 2001). Es existieren allerdings nicht nur bakterielle Enzyme die Indol hydroxylieren können. So sind zum Beispiel auch Vertreter aus der Proteinfamilie der humanen Cytochrom-P450-Enzyme fähig, diese Reaktion auszuführen.

1.2 Cytochrom-P450-Enzyme

1.2.1 Allgemeine Charakteristika

Die ubiquitär verbreiteten Cytochrom-P450-Enzyme gehören zu einer der größten Proteinfamilien. Vor etwa 60 Jahren wurden in Lebermikrosomen von Schweinen und Ratten Pigmentmoleküle entdeckt, die Kohlenstoffmonoxid binden und Licht einer Wellenlänge von 450 nm absorbieren konnten (Garfinkel & Klingenberg, 1958). Diese Eigenschaften führten zur Bezeichnung „P450“, wobei das „P“ für Pigment und „450“ für den Absorptionspeak bei 450 nm steht (Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Erst einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um Pigmente sondern um Proteine handelt (Omura & Sato, 1964).

Cytochrom-P450-Enzyme sind externe Monooxygenasen, die zur Superfamilie der Häm-Proteine gehören und in vielen verschiedenen Organismen wie Hefen, Bakterien, Pflanzen, Archaeobakterien und Säugetieren vorkommen (Guengerich *et al.*, 1996; Bernhardt, 2006). Ausgehend von ihrer großen Diversität bezüglich Funktion und Verbreitung sind die Cytochrome in verschiedene Familien und Unterfamilien eingeteilt. Diese Einteilung erfolgt in Abhängigkeit der Aminosäuresequenz. Besteht eine mehr als 40%-ige Sequenzidentität zwischen zwei Cytochromen, werden diese zur gleichen Familie zugeordnet. Gehören zwei

Cytochrome zu einer Familie und sind dabei weniger als 55% identisch, werden diese zu unterschiedlichen Subfamilien zugeordnet (Chapple, 1998; Nebert & Russell, 2002).

Cytochrome sind in höheren Pflanzen vor allem an verschiedenen biochemischen Stoffwechselprozessen beteiligt. Katalysiert werden zum Beispiel Reaktionen, die für die Synthese von Makromolekülen wie Lignin oder für die Bildung von Cutin wichtig sind. Außerdem sind Cytochrome an der Synthese von Pflanzeninhaltsstoffen (Alkaloide, Lipide) sowie an der Synthese von Hormonen, Signalmolekülen und Abwehrstoffen beteiligt (Denisov *et al.*, 2005). Als Beispiel für diese große Diversität sei hier erwähnt, dass etwa 272 Gene des Genoms von *Arabidopsis thaliana* für Cytochrom-P450-Enzyme kodieren (Jiang *et al.*, 2004). Im Säugetierorganismus werden den Cytochromen zwei große Hauptaufgaben zugeschrieben. Zum einen ist das die Biotransformation von Arzneistoffen als auch die Metabolisierung von chemischen Kanzerogenen. Zum anderen werden durch die von Cytochromen katalysierten Reaktionen physiologisch wichtige Komponenten wie Steroide, Fettsäuren und Prostaglandine synthetisiert (Cheng *et al.*, 2006). Zu diesen vielfältigen, komplexen Reaktionen die durch Cytochrome katalysiert werden zählen Decarboxylierungen, Hydroxylierungen, die Oxidation von Heteroatomen wie Schwefel und Stickstoff, Phenolkopplungen, Dealkylierungen und viele weitere (Morant *et al.*, 2003).

1.2.2 Struktur und Reaktionsmechanismus

Fast alle Cytochrom-P450-Enzyme teilen eine gemeinsame Struktur und Topologie, auch wenn die Sequenzidentität zwischen einigen Cytochromen weniger als 20% beträgt. Trotz dieser stark konservierten Struktur ist dennoch genügend Diversität bezüglich der Substratbindung vorhanden (Denisov *et al.*, 2005). Die meisten Cytochrome werden durch eine hydrophobe Helix, die sich in der Nähe des N-Terminus befindet, in oder an der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert, wobei der größte Teil des Proteins in das Cytosol ragt (Chapple, 1998). Dieser N-terminale Bereich fungiert sowohl als Anker als auch als ER-Signalsequenz. Zusätzlich konnten innerhalb der cytoplasmatischen Domäne der Cytochrome weitere ER-Targeting-Sequenzen identifiziert werden (Szczesna-Skorupa *et al.*, 1995). Für gewöhnlich folgt nach dieser Domäne eine Reihe basischer Aminosäuren, die vermutlich mit Lipiden der ER-Membran interagieren (Chapple, 1998). Nahe der N-terminalen hydrophoben Region befindet sich eine sehr Prolin-reiche Konsensussequenz, (P/I)PGPx(G/P)xP, die als flexible Verbindung die α -Helices stabilisiert und somit zur richtigen Konformation beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation des Prolins zu Alanin die Proteinstruktur zerstört und zum Verlust der Enzymaktivität führt (Yamazaki *et al.*, 1993). In prokaryontischen Cytochromen wurden weitere Aminosäuren-Reste identifiziert, wie

zum Beispiel eine Threonin-haltige Domäne, die als Bindetasche für das Sauerstoffmolekül fungiert. Für eukaryontische Cytochrome konnte eine Konsensussequenz, (A/G)Gx(D/E)T(T/S), identifiziert werden, die eine ähnliche Funktion ausübt (Chapple, 1998). Desweiteren besitzen alle Cytochrome eine Häm-Gruppe, die den Enzymen die Fähigkeit zur Sauerstoffbindung gibt. Diese Häm-Bindedomäne der Sequenz FxxGxxxCxG weist einen konservierten Cysteinrest auf und fungiert als fünfter Ligand für das zentrale Eisenatom im katalytischen Zentrum (Chapple, 1998). Abbildung 1.3 zeigt die typische Kristallstruktur und Topologie der Cytochrom-P450-Enzyme.



Abbildung 1.3. Gemeinsame X-Ray-Kristallstruktur und Topologie der Cytochrom-P450-Enzyme (Abb.: Denisov et al., 2005).

Die häufigste Reaktion, die Cytochrome katalysieren, ist die Einführung eines Sauerstoff-Atoms in die Kohlenstoffkette eines aliphatischen oder aromatischen Substrats. Das zweite Sauerstoffatom wird dabei zu Wasser reduziert (Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Substrate für diese komplexe Reaktion sind meist hydrophobe und in Wasser unlösliche Substanzen, aber auch Alkohole, Phenole und andere organische Komponenten (Denisov *et al.*, 2005). Um diese Reaktionen zu katalysieren, benötigen Cytochrome ein Reduktionsäquivalent, von dem sie zwei Elektronen beziehen können. Diese an die Cytochrome gebundenen Flavoproteine sind Cytochrom-P450-NADPH-Reduktasen oder auch das Cytochrom b_5 (Werck-Reichhart *et al.*, 2002). Dieser Reaktionsmechanismus, der zuerst in bakteriellen und mikrosomalen Systemen charakterisiert wurde, läuft generell in sechs Schritten ab. Zunächst bindet ein geeignetes Substrat in der Substratbindetasche, die auch den Häm-Ligand enthält (1). Dieser Enzym-Substrat-Komplex wird dann durch die Bereitstellung eines Elektrons durch die NADPH-Reduktase zu Fe^{2+} reduziert (2). Im Folgenden werden zwei Sauerstoffmoleküle an diesen Komplex gebunden (3). Nach der Oxygenierung erfolgt ein zweiter Elektronentransfer, durch

den das zuvor entstandene Produkt zu einem hypothetischen Eisen-Peroxid reduziert wird (4). Im Anschluß wird die Sauerstoffbindung unter Bildung von Wasser gespalten (5) und das aktivierte, am Eisen gebundene Sauerstoffatom kann am Substrat angreifen (6). Somit entsteht ein hydroxyliertes Produkt (Poulos, 1988). Abbildung 1.4 zeigt die einzelnen Schritte des Reaktionsmechanismus.

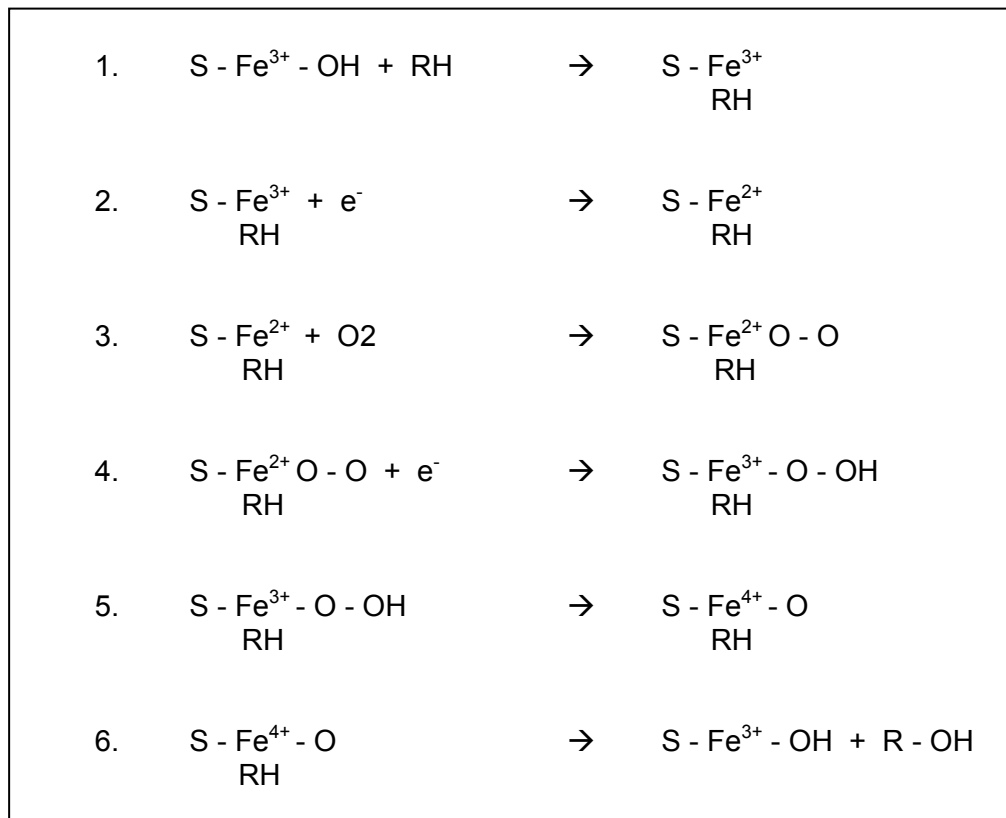


Abbildung 1.4. Reaktionsmechanismus der Cytochrom-P450-Enzyme. Erklärung der einzelnen Schritte im Text (Poulos, 1988).

1.2.3 Humane Cytochrom-P450-Enzyme

Gene des menschlichen Genoms kodieren etwa für 57 Cytochrom-P450-Proteine, deren Expression durch zahlreiche Faktoren stark reguliert ist. Ein großer Teil dieser Enzyme ist am Metabolismus von Steroiden, Fettsäuren und fettlöslichen Vitaminen beteiligt. Etwa 15 Cytochrome sind am Metabolismus von Arzneistoffen, Karzinogenen und anderen xenobiotischen Chemikalien beteiligt (Guengerich, 2003). Weitere 14 Cytochrome sind im Metabolismus von Sterolen involviert (Yang *et al.*, 2010). Innerhalb der Familie der humanen Cytochrome zeigt sich eine große Variation bezüglich der Funktionalität, der

Substratspezifität oder der Gewebespezifität (Inui & Ohkawa, 2005). Trotz der enormen Anzahl an Cytochromen ist es erstaunlich, dass nur fünf Cytochrome für etwa 95% des gesamten Arzneistoffmetabolismus verantwortlich sind (Guengerich, 2002; Guengerich, 2003). Dazu gehören die Vertreter CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4, wobei hier wiederum das Enzym CYP3A4 die Hälfte der aufgenommenen Arzneistoffe metabolisiert (Williams *et al.*, 2003; Guengerich *et al.*, 1995). In der heutigen Forschung spielen vor allem auch die Leber-spezifischen Cytochrome eine große Rolle, da die Aktivität dieser Enzyme eng mit der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Arzneistoffs verknüpft ist. Somit hat das Studium der Cytochrome zum Beispiel eine große Bedeutung bei der Identifizierung von aktiven Metaboliten oder bei der Generation neuer Arzneistoffmetabolite (Chefson & Auclair, 2006).

1.2.3.1 CYP2A6

Zur Unterfamilie CYP2A gehören insgesamt drei Mitglieder, CYP2A6, CYP2A7 und CYP2A13, wobei die Proteine CYP2A7 und CYP2A13 anscheinend in keinem Gewebe aktiv sind (Pelkonen *et al.*, 2000). Das humane CYP2A6 ist daher das am besten charakterisierte Enzym innerhalb dieser Unterfamilie. Es wird in der Leber exprimiert, wobei es gemessen am gesamten Cytochrom-Gehalt mit 4% nur einen geringen Anteil einnimmt (Taavitsainen *et al.*, 2001). Aufgrund der kompakten, hydrophoben Substratbindestelle werden vor allem kleine Substrate wie Indol, Cumarin oder Halothan metabolisiert (Gillam *et al.*, 1999; Sansen *et al.*, 2007). Zu den Funktionen von CYP2A6 zählen sowohl die Metabolisierung verschiedener Medikamente, wie zum Beispiel Fadozol und Losigamon, als auch die Aktivierung von Prodrugs, wie zum Beispiel Tegafur. Desweiteren kann die Expression von CYP2A6 durch verschiedene Antiepileptika oder Antibiotika induziert werden (Sansen *et al.*, 2007; Hukkanen, 2000). Die Katalysierung der Hydroxylierung von Cumarin an Position 7 ist eine weitere wichtige Funktion des CYP2A6, da vermutlich kein anderes Enzym der Leber dazu in der Lage ist (Raunio *et al.*, 2001). Die wichtigste Bedeutung allerdings kommt dem CYP2A6 im Nikotinstoffwechsel im menschlichen Körper zu. Dort wird Nikotin zu dem weniger wirksamen Alkaloid Cotinin metabolisiert. Die Hydroxylierung von S-(-)-Nikotin findet meist an der 5'-Position des Pyrrolringes statt, kann jedoch auch an der 2'-Position erfolgen, wodurch als Intermediat ein Aminoketon entstehen kann, das als direkter Vorläufer eines tabakspezifischen N-Nitrosamins (NNK) karzinogen wirkt und Lungenkrebs auslösen kann (Hecht *et al.*, 2000; Hukkanen *et al.*, 2010). Es konnten bereits viele genetische Polymorphismen des CYP2A6-Gens nachgewiesen und bisher 17 Allel-Varianten charakterisiert werden, die sich auf die Aktivität und die Expression des Enzym auswirken (Tiong *et al.*, 2010; Denton *et al.*,

2004). So wird zum Beispiel ein bestimmter Polymorphismus des Gens mit individuellen Unterschieden im Rauchverhalten in Zusammenhang gebracht. Die Deletion des gesamten Gens scheint daher mit einem verminderten Risiko in Verbindung zu stehen, an Lungenkrebs zu erkranken (Iwahashi *et al.*, 2004; Kamataki *et al.*, 1999). Da bisher, bis auf die oben genannten wichtigen Funktionen des CYP2A6, relativ wenig bezüglich der Regulation, der Aktivierung oder auch der Nutzung weiterer, möglicher Substrate bekannt ist, spielt die Charakterisierung von CYP2A6 auch heute noch eine bedeutende Rolle in der Forschung.

1.3 Cytochrom-P450-NADPH-Reduktasen

Die meisten Cytochrom-P450-Proteine sind keine unabhängigen Enzyme. Ihre katalytische Aktivität beruht auf der Kooperation mit einem Elektronendonator, einer Cytochrom-P450-NADPH-Reduktase (CPR) (Lu *et al.*, 1969). NADPH-Reduktasen, die zu einer kleinen Familie der Diflavin-Proteine gehören, sind integrale, membrangebundene Proteine, die zwei Elektronen von NADPH zu den verschiedenen Cytochromen transferieren (Jensen *et al.*, 2010). Der Elektronentransfer, der vermutlich über elektrostatische Interaktionen am endoplasmatischen Retikulum stattfindet, erfolgt dabei über zwei prosthetische Gruppen, FAD und FMN, die separate Funktionen einnehmen. Das Flavoprotein FAD bezieht die Elektronen von NADPH und das Protein FMN ist für den eigentlichen Transfer der Elektronen zum Cytochrom zuständig (Ro *et al.*, 2002; Vermilion *et al.*, 1981). Abbildung 1.5 zeigt schematisch den Aufbau und die Verankerung einer NADPH-Reduktase am beziehungsweise im endoplasmatischen Retikulum. Innerhalb der verschiedenen Spezies wie Bakterien, Pilze, Pflanzen oder Vertebraten zeigen alle Reduktasen eine Sequenzähnlichkeit von 30% – 90%, wobei die Domänen NADPH, FAD und FMN die am höchsten konservierten Regionen aufweisen (Portal *et al.*, 2008; Louerat-Oriou *et al.*, 1998).

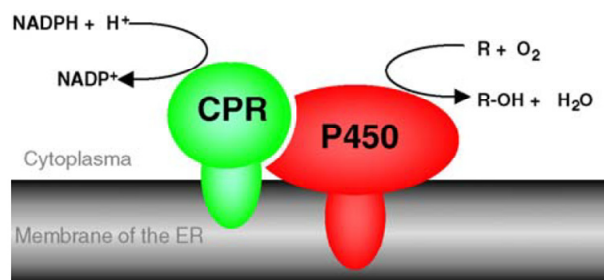


Abbildung 1.5. Aufbau und Lokalisation des NADPH-Reduktase-Cytochrom-Komplexes in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (Abb.: Bernhardt, 2006).

Bereits vor mehreren Jahren konnte zudem gezeigt werden, dass die NADPH-Reduktasen nicht nur mit den Cytochrom-P450-Enzymen interagieren, sondern auch Elektronen auf Cytochrom b_5 übertragen können, welches am Elektronentransport während der Fettsäure-Kettenverlängerung beteiligt ist (Ilan *et al.*, 1981). Der tierische Organismus wie auch Hefen besitzen grundsätzlich nur eine NADPH-Reduktase, beziehungsweise ein einziges dafür kodierendes Gen (Yang *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu besitzen höhere Pflanzen in der Regel zwei oder sogar mehr NADPH-Reduktasen, die meist auch unterschiedlich reguliert sind. So wird eine Reduktase zum Beispiel zu jeder Zeit in jedem Gewebe exprimiert, während die Bildung des anderen Reduktase-Proteins zum Beispiel erst durch Umweltstress induziert wird (Urban *et al.*, 1997). Desweiteren konnten aus mikrosomalen Fraktionen der Pflanze *Helianthus tuberosus* sogar drei Reduktase-Isoformen isoliert werden, wobei hier nicht geklärt ist, ob drei verschiedene Gene für drei individuelle Proteine kodieren, oder ob ein Protein exprimiert wird, welches posttranslational modifiziert wird. Somit stellt sich auch hier die Frage nach der genauen physiologischen Rolle der verschiedenen Isoformen (Benveniste *et al.*, 1991; Mizutani *et al.*, 1998).

1.3.1 Cytochrom-P450-NADPH-Reduktase ATR2

Wie bereits im oberen Abschnitt erwähnt, besitzen Pflanzen mindestens zwei NADPH-Reduktasen. Auch aus *Arabidopsis thaliana* konnten zwei verschiedene Gene beziehungsweise die zugehörigen Proteine isoliert werden (Urban *et al.*, 1997). Die zwei Isoformen ATR1 und ATR2 zeigen etwa 63% Sequenzidentität auf Aminosäurelevel und besitzen beide 17 Exons und 16 Introns. Interessant dabei ist, dass die Gensequenzen an genau den gleichen Stellen durch Introns geteilt sind, was die These unterstützt, dass beide Gene durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufer-Gens entstanden sind (Mizutani *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktase ATR1 in allen Blattorganen durchgehend stark exprimiert wird, wobei die Expression der Reduktase ATR2 durch Verwundung oder Lichtzufuhr vor allem in den Blättern, der Sprossachse und in den Blüten induziert werden konnte (Mizutani *et al.*, 1998). Die Reduktase ATR2 zeigt im Gegensatz zu ATR1 einen sehr hohen Serin-Anteil innerhalb der ersten 45 Aminosäuren (Sequenz: MSSSSSSSTSM...). Diese Sequenz ist in den meisten Fällen eine Chloroplasten-Targeting-Sequenz, sodass die Vermutung nahe liegt, dass die Reduktasen in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorliegen, ATR1 im Cytosol und ATR2 im Chloroplast (Hull *et al.*, 2000). Zur besseren Charakterisierung wurden die beiden Reduktasen in mehreren Organismen exprimiert. Die Expression von ATR1 und ATR2 in *Saccharomyces cerevisiae* zeigte die Ansammlung der Proteine in der ER-Membran. Desweiteren waren beide Proteine in der

Lage, mit dem Cytochrom CYP73A5, das als erstes Cytochrom im Phenylpropanoid-Syntheseweg die Funktion einer Cinnamat-4-Hydroxylase übernimmt, zu kooperieren (Urban *et al.*, 1997; Bell-Lelong *et al.*, 1997). Ähnliche Ergebnisse konnten bei Expression der Reduktasen in Insektenzellen erzielt werden. Die in den mikrosomalen Fraktionen detektierten Proteine kooperierten ebenso mit dem Cytochrom CYP73A5 (Mizutani *et al.*, 1997; Mizutani *et al.*, 1998). Hull *et al.* exprimierten die Reduktase ATR2 in *E. coli*, dabei wurde die N-terminale Serin-haltige Sequenz entfernt, um eine effizientere Expression zu ermöglichen (Pernecky *et al.*, 1996). Das Protein konnte in der Membranfraktion detektiert werden. Auch die Kooperation mit dem Cytochrom CYP79B2, das ebenfalls vermutlich in den Chloroplasten aktiv ist und dort Tryptophan zu Indol-3-acetaldoxim metabolisiert, konnte bei einer Co-Expression in Bakterien nachgewiesen werden (Hull *et al.*, 2000; Bak *et al.*, 1998). Letztendlich steht ein Nachweis der Lokalisation der ATR2 und ihrer Funktion in der Pflanze noch aus.

1.4 Biosynthese indigoider Vorstufen durch Expression des humanen CYP2A6

1.4.1 Expression von CYP2A6 in *Escherichia coli*

Prinzipiell ist es möglich, jede funktionelle cDNA eines Cytochroms in Bakterien zu exprimieren. Bakterien werden als Expressionssystem deshalb oft benutzt, da diese leicht zu manipulieren und zu kultivieren sind und meist eine sehr hohe Expressionsrate erzielt werden kann (Guengerich *et al.*, 1996). Bei der Expression von Cytochromen treten allerdings oftmals Probleme auf, da für die funktionelle Expression die Co-Expression eines NADPH-Reduktase-Gens notwendig ist (Fujita *et al.*, 2002). Auch die Signalsequenzen der meisten Cytochrome, die zur Anheftung an das endoplasmatische Retikulum notwendig sind, können sich störend auf eine erfolgreiche Expression auswirken (Pernecky *et al.*, 1996; Barnes, 1996). Ist die Expression aber gelungen, eignet sich das bakterielle System sehr gut, um große Mengen an funktionellem Protein zu produzieren.

Gillam *et al.* konnten zeigen, dass die Expression des humanen Cytochroms CYP2A6 in *E. coli* zur Bildung von Indigo führt. Der bicistronische Vektor, der neben der funktionellen cDNA des Cytochroms CYP2A6 die cDNA der humanen NADPH-Reduktase enthielt, wurde in *E. coli* Zellen transformiert und diese kultiviert. Nach einer relativ kurzen Inkubationszeit färbten sich die Kulturen blau. Mittels massenspektrometrischer und chromatographischer Methoden wurde diese Substanz als Indigo identifiziert. Zusätzlich wurde eine rötliche Komponente als Indirubin identifiziert (Gillam *et al.*, 1996). Offensichtlich sind Enterobakterien dazu in der Lage, Indol als Zwischenprodukt des Tryptophanmetabolismus zu bilden, welches dann durch das CYP2A6 zu Indoxyl hydroxyliert wird und sich anschließend unter Oxidation Indigo bildet.

(Gillam *et al.*, 2001). Die Beobachtung, dass Patienten, die eine Störung der Tryptophanabsorption zeigen, oft einen blau-purpurnen Harn aufweisen, ist wohl auf diesen Effekt zurückzuführen. Vermutlich metabolisieren intestinale Darmbakterien Tryptophan zu Indol, welches dann resorbiert, in der Leber zu Indoxylsulfat umgewandelt und dann ausgeschieden wird (Gillam *et al.*, 2000).

Die Entdeckung, dass ein humanes Cytochrom zur Indolhydroxylierung in der Lage ist, eröffnet vielfältige und neue Möglichkeiten der biotechnologischen Anwendung, zum Beispiel die Produktion von blauen Pigmenten direkt in Pflanzengeweben oder Baumwollfasern. Hierfür müssen allerdings die Expressionsbedingungen und Eigenschaften der heterologen Gene im neuen Wirt charakterisiert und optimiert werden.

1.4.2 Stabile Kernexpression des humanen CYP2A6 in *Nicotiana tabacum*

Da es wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben durch Zufall gelungen war, den blauen Farbstoff Indigo durch Expression des Cytochroms CYP2A6 in Bakterien zu erzeugen, stellte sich die Frage, ob es möglich ist, den natürlichen Syntheseweg von Indoxyl oder Indigo in transgenen Tabakpflanzen nachzuahmen. Um das zu untersuchen, wurde die vollständige CYP2A6-cDNA in Tabakpflanzen exprimiert und mehrere transgene Linien erzeugt (Dueckershoff *et al.*, 2005). Obwohl das CYP2A6 aktiv war, was an einem modifizierten Nikotinmetabolismus erkennbar war, konnte zu keiner Zeit die Bildung des Farbstoffes Indigo nachgewiesen werden. Der wahrscheinlichste Grund dafür lag im Fehlen des Substrates Indol. Aus diesem Grund wurde das bereits unter 1.1.1 erwähnte Enzym BX1, welches als homologes Enzym der Tryptophansynthase α freies Indol bilden kann und zudem sehr aktiv ist, zur Erzeugung von Doppeltransformatanten genutzt (Frey *et al.*, 2000; Gierl *et al.*, 20001). Transgene pPSI-2A6 Pflanzenlinien wurden mit dem Plasmid, das die für das Enzym BX1 kodierende cDNA trägt, transformiert und kultiviert. Die so erzeugten Doppeltransformatanten zeichneten sich durch einen sehr starken und charakteristischen Indol-Geruch aus, das Enzym BX1 war demnach aktiv und bildete freies Indol. Blattmaterial dieser Pflanzenlinien wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf das Vorhandensein der Indigo-Vorstufe Indican untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Pflanzen, die beide Gene (*CYP2A6* und *BX1*) exprimierten, eine zusätzliche Indican-Zone aufwiesen. Für Pflanzen, die entweder nur das Cytochrom CYP2A6 oder nur BX1 bildeten, konnte kein Indican nachgewiesen werden (Abbildung 1.6).

Es lässt sich somit sagen, dass es grundsätzlich möglich ist, den Biosyntheseweg von Indigo bzw. Indican, wie er natürlicherweise in den Färbepflanzen erfolgt, nachzuahmen. Das durch das Enzym BX1 gebildete Indol dient tatsächlich als Substrat für das Cytochrom CYP2A6,

Indoxyl entsteht und wird als Indican gespeichert. Im Vergleich zu den verschiedenen Färbepflanzen war der Indican-Gehalt eher gering, was eventuell auf eine generell schwache Expression in kerntransformierten Tabakpflanzen oder auf Gene-Silencing-Effekte zurückzuführen sein könnte. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das in ausdifferenzierten Blättern in großer Menge vorhandene Nicotin als Substratinhibitor agieren kann und somit die Aktivität von CYP2A6 herabsetzen könnte. Letztendlich könnte auch eine nicht ausreichende Kooperativität zwischen dem humanen P450 und der pflanzlichen NADPH-Reduktase für diese geringe Aktivität verantwortlich sein. Entscheidend im Zusammenhang mit der biotechnologischen Anwendung war, dass zu keiner Zeit eine Veränderung des Phänotyps der Pflanzen, das heißt, eine Blaufärbung durch Bildung von Indigo, nachgewiesen werden konnte. Deshalb sollten alternative Expressionswege und Proteinlokalisationen sowie Eigenschaften der beteiligten Enzyme untersucht werden.

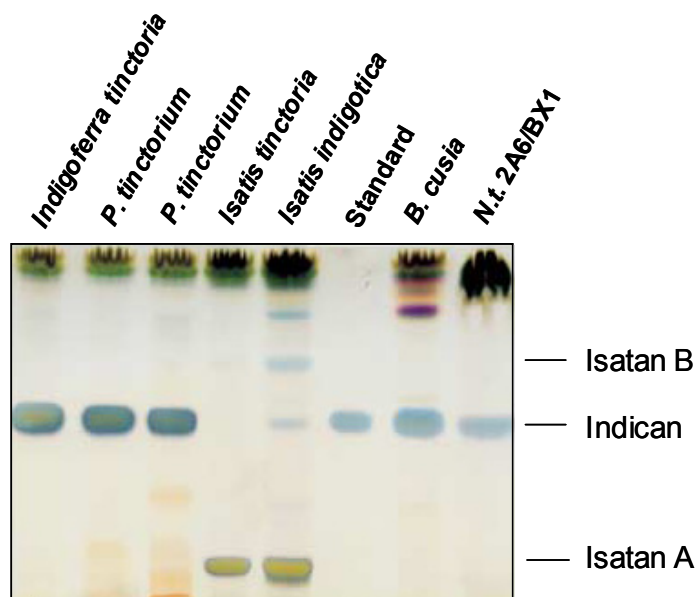


Abbildung 1.6. Dünnschichtchromatographie von Blattextrakten verschiedener Färbepflanzen und einer 2A6/BX1-Linie. Als Standard dienten 20 µl Indican (Abb.: Warzecha *et al.*, 2007)

1.5 Proteinsynthese nach Transformation des Chloroplastengenoms

Eine alternative Methode zur Kerntransformation, mit der deutliche höhere Ausbeuten an rekombinanten Proteinen erzeugt werden können ohne die negativen Effekte des Gene-Silencing oder Positionseffekte aufzuweisen, ist die stabile Transformation des Plastidengenoms. Die Chloroplastentransformation wurde erstmals erfolgreich für die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben (Boynton *et al.*, 1988). Zwei Jahre später gelang es, das Plastidengenom von *Nicotiana tabacum* zu transformieren, was viele interessante Möglichkeiten zur Produktion wichtiger rekombinanter Proteine eröffnete (Svab *et al.*, 1990). Ein wichtiger Vorteil gegenüber der Kerntransformation liegt in der zielgerichteten Integration des Transgens in das Plastidengenom. Durch die das Transgen flankierenden Bereiche innerhalb der Expressionskassette, die homolog zu Sequenzabschnitten der plastidären DNA sind, erfolgt die Integration durch homologe Rekombination (Maliga, 2003). Somit können durch die gerichtete Integration deutlich höhere Proteinakkumulationsraten von bis zu 40% des Gesamtproteingehalts erzielt werden (Verma *et al.*, 2008; Horn *et al.*, 2004). Auch der hohe Polyploidiegrad der plastidären DNA trägt zur Steigerung der Proteinakkumulationsrate bei (Bock, 2001). Weiterhin scheinen in den Chloroplasten keine Glycosylierungen stattzufinden, eine Tatsache, die im Hinblick auf die Expression des humanen CYP2A6 und die damit verbundene Synthese indigoider Komponenten von Vorteil sein könnte (Maliga, 2004; Tregoning *et al.*, 2003). Da die Chloroplasten als semiautonome Organellen mit prokaryotischer Herkunft auch eine eigene Transkriptions- und Translationsmaschinerie besitzen, andere Proteinabbaumechanismen als im Cytosol vorhanden sind und auch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen stattfinden können, bietet sich dieses Expressionssystem an, um rekombinante Proteine stabil und in größerer Menge zu produzieren und näher zu charakterisieren (Maliga, 2002; Maliga, 2004; Bock, 2007).

1.6 Fragestellung

Eukaryotische Cytochrome sind vielseitige Biokatalysatoren. Durch die zahlreichen von ihnen katalysierten Biotransformationsreaktionen stellen sie interessante Werkzeuge für das gezielte Metabolic Engineering in unterschiedlichsten Organismen dar. Im Falle von Pflanzen stellt die Erzeugung von neuen Farbvarianten ein beeindruckendes Beispiel einer solchen gezielten Veränderung des Metabolismus durch Cytochrome dar. Es konnten bereits erfolgreich transgene Tabaklinien erzeugt werden, die durch Suppression von zwei Genen, die an der Anthocyan synthese beteiligt sind, neue Blütenfärbungen ausbildeten (Nakatsuka *et*

al., 2007). Als weiteres Beispiel sei hier die Integration zweier Monooxygenasen in das Genom von Petunien sowie Rosen und der daraus resultierenden Neubildung von Delphinidin-Derivaten erwähnt, wodurch die Färbung der Petalen in einen blau-violetten Farbton erreicht wurde. Obwohl das Ziel einer starken Blaufärbung durch die Anthocyane nicht erreicht werden konnte, zeigt dieses Beispiel doch deutlich das Potenzial einer derartigen gezielten Veränderung des Metabolismus (Holton *et al.*, 1993).

Vorarbeiten haben gezeigt, dass selbst heterologe (humane) Cytochrom-P450-Enzyme in aktiver Form in Pflanzen gebildet werden können. Damit bieten sich nun ganz neue Möglichkeiten des Metabolic Engineering, so zum Beispiel die gezielte Manipulation des Sekundärmetabolismus von Medizinalpflanzen, um neue pharmakologisch aktive Substanzen zu generieren. Um das System zu optimieren, sollten nun am Beispiel des humanen CYP2A6 und der Indigobildung folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Die Expression von *CYP2A6* im Kerngenom führte nicht zur Bildung von Indigo sondern lediglich zu einer geringen Synthese des Glycosids Indican. Die Expression in allen Entwicklungsstufen der Pflanzen war auch nicht stabil und resultierte damit in einer sehr geringen Akkumulationsrate des Metabolits. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine alternative Lokalisation, nämlich die Integration des Transgens in das Chloroplastengenom und die lokale Expression untersucht werden. Hier sollte evaluiert werden, ob diese Alternative zur gesteigerten Expression und damit zur erhöhten Akkumulation der Reaktionsprodukte führt. Durch die Lokalisation des Reaktionsweges in den Chloroplasten sollte auch eine rasche Glycosylierung des Intermediats Indoxyl verhindert werden. Damit sollte auch die direkte Bildung von Indigo ermöglicht werden.
2. Kerntransformationen mit *CYP2A6* haben gezeigt, dass das humane Enzym mit der pflanzlichen Reduktase kooperieren kann. Da bisher nicht bekannt ist, ob eine entsprechende Cytochrom-P450-Reduktase auch in den Plastiden vorkommt, sollte zusätzlich auch eine humane Reduktase co-exprimiert und diese Pflanzen charakterisiert werden.
3. Weiterhin sollten transplastome Pflanzenlinien erzeugt werden, die neben der cDNA des *CYP2A6* zusätzlich das Gen *bx1* zur Bereitstellung freier Mengen Indol exprimierten. Dies könnte generell zur Synthese von Indican/Indigo führen.

4. Obwohl endogene pflanzliche P450-Enzyme mit Chloroplastenlokalisation beschrieben wurden, ist über entsprechende P450-Reduktasen im Chloroplasten nichts bekannt. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die P450-Reduktase ATR2 aus *Arabidopsis thaliana* als geeigneter pflanzlicher Kandidat näher charakterisiert werden. Diese Charakterisierung beinhaltet vor allem die Verifizierung der Lokalisation in den Chloroplasten, aber auch die bakterielle Expression sowie die Charakterisierung der Funktion der Signalsequenz.

2. Material

2.1 Laborgeräte

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Zentrifuge 5417 R | Eppendorf (Hamburg) |
| Zentrifuge 5804 R | Eppendorf (Hamburg) |
| Wärmeschrank B 5050 E | Heraeus, Roth (Karlsruhe) |
| Hybridisierungssofen HB- 1000 | UVP (Cambridge) |
| Inkubationsschüttler Ecotron | Infors, Bottmingen |
| Metallblock-Thermostat Thermochem | Liebisch, Bielefeld |
| Thermomixer Comfort | Eppendorf, Hamburg |
| Wasserbad | Köttermann (Hänigsen) |
| Schüttler HS 250 basic | IKA, Staufen |
| Schüttler neolab | Neolab, Heidelberg |
| Vortexer VF2 | Janke & Kunkel (Staufen) |
| Analysenwaage Atilon ATL-84-I | AccuLab, Neolab (Göttingen) |
| Präzisionswaage Atilon ATL-2202 | AccuLab, Neolab (Göttingen) |
| PerfectBlue Agarose-Gelsystem | Peqlab (Erlangen) |
| Intas Agarose-Geldokumentation | Intas (Göttingen) |
| SDS-PAGE Apparatur PerfectBlue | Peqlab (Erlangen) |
| Tank-Elektroblotter PerfectBlue | Peqlab (Erlangen) |
| Microplate Reader INFINITE M200 | Tecan, Crailsheim |
| Power-Supply NPAC | BioRad (München) |
| pH-Meter Typ 646/647/647-1 | Knick (Berlin) |
| NanoDrop ND-1000 | Peqlab (Erlangen) |
| Mastercycler R ep | Eppendorf (Hamburg) |
| Thermocycler PCR Primus 25 advanced | Peqlab (Erlangen) |
| Genegun | BioRad PDS-1000/he (München) |

2.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| Nylonmembran (porablot NY plus) | Machery-Nagel (Düren) |
| Hybond-P PVDF-Membran | Amersham (Freiburg) |
| Fuji medical X-Ray Film | Hartenstein (Würzburg) |
| Hyperfilm™ MP | Amersham (Freiburg) |
| Whatmanpapier | Hartenstein (Würzburg) |
| Goldpartikel (Micron Gold 0.6 µm) | BioRad (München) |
| Rupture Disc | BioRad (München) |
| Macrocarrier | BioRad (München) |
| Infiltrationsspritzen, 1 ml | Hartenstein (Würzburg) |
| Tris-Glycin-Fertiggele, 4-12 % | Appllichem (Darmstadt) |
| Gene Ruler 1kb DNA-Ladder | MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Desoxyribonukleotide | MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Prestained Proteinmarker | MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) |

2.3 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien des Reinheitsgrades „pro analysi“ von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Appllichem (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

| | |
|------------------------------|------------------------|
| TEMED | Roth (Karlsruhe) |
| Acrylamid/Bisacrylamid 37 % | Appllichem (Darmstadt) |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Roth (Karlsruhe) |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Appllichem (Darmstadt) |
| Phenylmethylsulphonyl (PMSF) | Sigma (Deisenhofen) |
| Agarose | Appllichem (Darmstadt) |
| Bacto-Agar | BaccaraRose (Sonsbeck) |
| Bacto-Trypton | Appllichem (Darmstadt) |

| | |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Hefeextrakt | Applichem (Darmstadt) |
| Murashige & Skoog Salze | Duchefa (Haarlem, NL) |
| Myo-Inositol | Applichem (Darmstadt) |
| Glycerin | Applichem (Darmstadt) |
| EDTA | Applichem (Darmstadt) |
| peqGold TriFast™ | Peqlab (Erlangen) |
| CDP Star | Roche Diagnostics (Mannheim) |
| RNase | Applichem (Darmstadt) |
| Cellulase R10 | Duchefa (Haarlem, NL) |
| Macerozym R10 | Duchefa (Haarlem, NL) |
| Blocking reagent | Roche Diagnostics (Mannheim) |
| Ethidiumbromid | Roth (Karlsruhe) |
| β-Mercaptoethanol | Applichem (Darmstadt) |
| Bromphenolblau | Applichem (Darmstadt) |
| [9,10- ³ H] Palmitinsäure | Hartmann Analytic (Braunschweig) |
| Amplify-Lösung | GE Healthcare (München) |

2.4 Enzyme

Folgende Restriktionsenzyme mit den dazugehörigen Puffern wurden von der Firma MBI – Fermentas bezogen:

| | | | |
|----------------|---------------|--------------|--------------|
| <i>AvrII</i> | <i>BamHI</i> | <i>BglII</i> | <i>BsaI</i> |
| <i>BspHI</i> | <i>BstEII</i> | <i>DraII</i> | <i>EcoRI</i> |
| <i>HindIII</i> | <i>KpnI</i> | <i>NcoI</i> | <i>NdeI</i> |
| <i>NheI</i> | <i>NotI</i> | <i>PstI</i> | <i>SacI</i> |
| <i>Sall</i> | <i>XbaI</i> | <i>XhoI</i> | |

2.5 Pufferlösungen

Alle verwendeten Puffer wurden in zehnfacher Konzentration angesetzt und für 20 min bei 120°C autoklaviert. Vor Gebrauch wurden entsprechend verdünnte Arbeitslösungen hergestellt. Die genauen Pufferzusammensetzungen sind dem Methodenteil zu entnehmen.

2.6 Antikörper

Die für die Immunopräzipitation verwendeten Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology bezogen:

mouse anti-CYP2A6
mouse anti-GFP
rabbit anti-CYPOR
goat anti-mouse-HRP
goat anti-rabbit-HRP

2.7 Kulturmedien

| | | |
|------------|-------------------|--------|
| LB-Medium: | 10 g/l Trypton | |
| | 10 g/l NaCl | |
| | 5 g/l Hefeextrakt | pH 7.0 |

| | | |
|------------|----------------------|--------|
| MS-Medium: | 30 g/l Saccharose | |
| | 4,3 g/l MS-Salze | |
| | 0,1 g/l Myo-Inositol | |
| | 1 ml/l B5 Vitamine | pH 5.7 |

| | | |
|--------------|--------------------------|--------|
| RMOP-Medium: | 30 g/l Saccharose | |
| | 4,3 g/l MS-Salze | |
| | 0,1 g/l Myo-Inositol | |
| | 1 ml/l BAP (100 mg/ml) | |
| | 0,1 ml/l NAA (100 mg/ml) | pH 5.8 |

Zur Herstellung von Agarplatten wurden den entsprechenden Flüssigmedien vor der Sterilisation 15 g Bacto-Agar zugegeben. Die Sterilisation erfolgte für 30 min bei 121°C. Nach Abkühlen konnten die Antibiotika zugegeben werden.

2.8 Bakterienstämme

| | |
|---|--|
| <i>Escherichia coli</i> TOP10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i> |
| BL21 (DE3)pLysS | F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R) |
| <i>Escherichia coli</i> Origami TM B | F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> <i>lacY1</i> <i>ahpC</i> <i>gor522::Tn10</i> (Tc ^R) <i>trxB::kan</i> |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 | PM90RK GM ^R Rif ^R |

Die verwendeten Bakterienstämme wurden entweder in flüssigem Medium oder auf Agarplatten kultiviert. Die Anzucht erfolgte bei Raumtemperatur oder bei 30°C über Nacht. Zur Selektion wurden den Nährmedien verschiedene Antibiotikallösungen zugegeben.

| | |
|---------------|-----------|
| Ampicillin | 100 µg/ml |
| Spectinomycin | 100 µg/ml |
| Kanamycin | 50 µg/ml |
| Carbenicillin | 50 µg/ml |
| Rifampicin | 50 µg/ml |
| Gentamycin | 15 µg/ml |
| Tetracyclin | 5 µg/ml |

2.9 Pflanzenmaterial

Zur Erzeugung transgener Pflanzenlinien wurden verschiedene Tabakpflanzen verwendet. Für Kern – und Chloroplastentransformationen standen Wildtyp-Pflanzen der Gattung *Nicotiana tabacum* cv. Petit-Havana zur Verfügung. Für die transiente Expression wurden Wildtyp-Pflanzen der Gattung *Nicotiana benthamiana* verwendet. Alle Pflanzen stammten aus den Versuchsgewächshäusern des FB10 Botanik der TU Darmstadt.

2.10 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die gefriergetrockneten Primer wurden auf eine Konzentration von 200 mM verdünnt. Die Konzentration der Arbeitslösung betrug 20 mM.

| | |
|-------------|--|
| ATR2-101L | TTT GGT CTC AAG GTA TGT CCT CTT CTT CTT CTT CGT CAA CCT CCA TGA TCG ATC TCA TGG CAG CAA TCA TCA AAG GAG |
| ATR2-102L | ACATCTCATGAGCTCTTCTTCTTCTTCGCAACC |
| ATR2-102 | TCC CAT GGC AGC AAT CAT CAA AGG AG |
| ATR2-103 | CTC CAT GGT TAT AGA GAA TCG TCA ATT CGC C |
| ATR2-104 | CGC CAT GGT TGT TAC CAC TTC CAT TGC |
| ATR2-201 | GGT CTA GAT TAC TCG AGC CAT ACA TCT CTA AGA TAT CTT CCA CTC G |
| ATR2seq-101 | GAG ATG GTG AGC CTA CCG ACA ATG C |
| ATR2seq-102 | GGA ATT TGA CAT TGC TGG AAG TGG A |
| ATR2seq-201 | GAA TGG AGC TAA TCC AGT CCC TGG AC |
| M13 for | GTA AAA ACG ACG GCC AG |
| M13 rev | CAG GAA ACA GCT ATG A |
| Y1.1 rev | AGTTTCTAGAGAGCTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTG |
| Y1.2 rev | AGTTGGTCACCGAGCTCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTGTAC AGCTCGTCCATGC |
| YFP-105 | ATC TCG AGA TGG TGA GCA ACC GCG AGG |
| 2A6opt 101 | ATTCGTGAATCACTGCTTCCATATAA |
| 2A6opt 102 | TGAGGCCAGTTAATTAACCATGGCTCATATGGC |
| 2A6opt 103 | ATCATATGTCCGTGTGGCAGCAAAGG |

| | |
|------------|---|
| 2A6opt 201 | TCACGAACTGTCAGTAACGTTATCTC |
| 2A6opt 202 | GCCGGTGACCTCTAGATTACTACCTAG |
| 2A6 103 | TCCATTGTCTTTGGGGACCGC |
| 2A6 203 | AGGGCATCTTGGCCCCGTCC |
| 2A6 110 | TAGGTACCAATATGGCTGCTTCAGGAATGTTATTAGTGGCC |
| 2A6 205 | AGTCTAGATTAGCGGGGCAGGAAGCTC |
| hNPR 101 | CAG GAT CCG GCT GAC TCC CAC GTG GAC ACC |
| hNPR rev | ATAAGCTTCTAGCTCCACACGTCCAG |
| hNPR 110 | ACCGACAATGCCCAGGACTTCTACG |
| hNPR 210 | AGCAGCTCACACAGGTGGTCGATG |
| BX1 110 | ATCTCATGGCCAAGGGCAAGACC |
| BX1 210 | GCCGAGATCGATCCGGAACGAC |

2.11 Genmaterial

Zur Charakterisierung der NADPH-Reduktase ATR2 aus *Arabidopsis thaliana* wurden modifizierte Reduktase-Sequenzen von der Firma Mr. Gene bezogen. Die vollständigen Aminosäuresequenzen sind dem Anhang zu entnehmen.

Zur Transformation von *Nicotiana tabacum* mit dem humanen Cytochrom CYP2A6 wurde eine optimierte Sequenz von der Firma Mr. Gene bezogen. Die vollständige Aminosäuresequenz ist ebenfalls dem Anhang zu entnehmen.

2.12 Vektoren

Klonierungsvektoren

pCR 2.1[®] Dieser 3.9 kb große Vektor dient zur Klonierung von DNA, die durch Amplifikation mit einer *Taq*-Polymerase sticky-ends aufweist. Er vermittelt Resistenzen gegen Ampicillin und Kanamycin.

pCR[®]-Blunt PCR-Fragmente, die mittels Pfu-Polymerase amplifiziert wurden und blunt-ends besitzen, wurden in den 3.5 kb großen Vektor kloniert.

pHK20 Dieser 3.3 kb große Vektor dient ebenfalls als Subklonierungsvektor. Nach Einbringen des gewünschten Gens in eine Expressionskassette, kann diese dann ausgeschnitten und vollständig in einen Expressionsvektor eingebracht werden.

Bakterielle Expressionsvektoren

pQE60 Zur Expression des gewünschten Gens in Bakterien wurde dieser 3.4 kb große Vektor verwendet, da er zwischen der multiple cloning site und dem Stop-Codon ein His-Tag trägt. Somit lassen sich rekombinante Proteine schnell und leicht aufreinigen.

pSE380 Dieser 4.5 kb große Vektor eignet sich ebenfalls zur Expression des gewünschten Gens in Bakterien, trägt allerdings kein His-Tag.

Chloroplastenexpressionsvektoren

pKP9 Zur Expression der Transgene in den Chloroplasten von Tabakpflanzen wurde der Vektor pKP9 verwendet. In diesem befindet sich die multiple cloning site zwischen den plastidären Genen *psbC*, *trnS*, *ycf9* und *psaB*, wodurch eine gerichtete homologe Rekombination gewährleistet wird.

Vektoren zur transienten Expression (ICON Genetics)

pICH10990 Dieser Vektor fungiert als 3'-Modul und enthält die multiple cloning site zum Einbringen des Inserts sowie eine Rekombinationsstelle zur Rekombination mit einem 5'-Modul.

| | |
|-----------|---|
| pICH11599 | Dieser Vektor ist ein weiteres 3'-Modul, die Integration des Inserts erfolgt hierbei über eine andere Restriktionsschnittstelle. |
| pICH10881 | Der Vektor pICH10881 codiert für die Rekombinase, welche in den Zellkern geleitet wird und dort das 5'-Modul und das 3'-Modul über die Rekombinationsstellen miteinander verknüpft. |
| pICH7410 | Dieser ICON-Vektor stellt ebenfalls ein 3'-Modul dar und codiert für das Protein GFP. Das Modul wird in erster Linie als Positiv-Kontrolle verwendet. |
| pICH15879 | Dieser Vektor stellt ein 5'-Modul dar, welches unter anderem für ein Movement-Protein kodiert und als cytosolisches Targeting verwendet wird. |

2.13 Molekularbiologische Kits

| | |
|--|-------------------|
| Original TA Cloning® Kit | Invitrogen |
| Original pCR®-Blunt Cloning Kit | Invitrogen |
| Nucleo Spin Gel Extraction Kit II | Machery und Nagel |
| Pure Link™ HiPure Plasmid Midiprep Kit | Invitrogen |
| NucleoBond® PC 100 Midiprep Kit | Machery und Nagel |
| PCR DIG Probe Synthesis Kit | Roche Diagnostics |
| Cheluminate-HRP Detection Kit | Applichem |

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Extraktion von RNA aus Pflanzenzellen

Die zur Extraktion von RNA verwendete Methode von Chomczynski beruht auf der Isolierung von nicht degenerierten Nukleinsäuren mit Guanidiniumsalzen und Phenol. Das entsprechende Blattmaterial wurde unter Verwendung von flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisiert. Zu je 100 mg Blattgewebe wurde 1 ml Tritidy Reagenz gegeben und die Mischung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform, einer weiteren Inkubationszeit von 3 min und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 4°C, konnte die entstandene obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Diese Phase wurde erneut mit Chloroform versetzt und zentrifugiert, um noch vorhandene phenolische Rückstände zu entfernen. Anschließend wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und die Mischung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 12000 x g) für 10 min. Der entstandene Niederschlag wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl Wasser resuspendiert und 10 min bei 60°C inkubiert. Der Gehalt an RNA konnte nun photometrisch bestimmt werden.

3.1.2 Extraktion von pflanzlicher DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Pflanzenzellen erfolgte nach einer Methode von Rogers & Bendich (1995). Dazu wurden je 100 mg Blattmaterial geerntet und unter Verwendung von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Jede Probe wurde mit 750 µl Extraktionspuffer und anschließend mit 750 µl Chloroform versetzt, gemischt und für 30-60 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 7500 x g. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der genomischen DNA mit 750 µl Isopropanol versetzt. Das nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 20000 x g) erhaltene DNA-Pellet wurde zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. Der Gehalt wurde photometrisch bestimmt.

Extraktionspuffer: 1% Sarcosyl
0.8 M NaCl
0.022 M EDTA
0.22 M Tris-HCl pH 7.8
0.8% CTAB
0.14 M Mannitol

Vor Verwendung des Puffers wurde dieser mit 2-Mercaptoethanol versetzt (14 µl Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer).

3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Präparation von Plasmid-DNA aus bakteriellen Flüssigkulturen erfolgte nach der Methode von Birnboim & Doly (1979). Zur Isolierung von low copy Plasmiden wurden 3 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Zur Gewinnung von high copy Plasmiden wurden 1.5 ml der Kultur verwendet. Das Zellpellet wurde in 200 µl Resuspendierungspuffer gelöst. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer und kurzer Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Zur Ausfällung von genomischer DNA wurden 200 µl Neutralisationspuffer zugegeben. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 20000 x g, RT). Der klare Überstand wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt und zur Fällung der Plasmid-DNA erneut zentrifugiert (15 min, 20000 x g, RT). Das entstandene Pellet wurde zunächst mit 70 %-igem, kaltem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 25 µl Wasser aufgenommen und resuspendiert. Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das *Pure Link Plasmid Midiprep Kit* von Invitrogen verwendet.

Resuspendierungspuffer: 50 mM Glucose
20 mM Tris-HCl pH 8.0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase

Lysepuffer: 0.2 M NaOH
1 % SDS

Neutralisationspuffer: 3 M KOAc pH 4.8

3.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonucleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA-Moleküle schneiden können. Diese erkennen die DNA an spezifischen Sequenzen und hydrolysieren die Phosphorsäurediesterbindung. Diese Aufspaltung erfolgt meist an palindromischen Sequenzen, die aus 4-8 Basenpaaren bestehen. Auf diese Weise entstehen verschieden große DNA-Fragmente mit überhängenden (sticky ends) oder glatten Enden (blunt ends), die dann in einer anschließenden Ligationsreaktion in ein linearisiertes Plasmid eingefügt werden können.

Restriktionsansatz: 3 µl DNA
1 µl Restriktionsenzym
1 µl 10 x Reaktionspuffer
0,5 µl RNase
4,5 µl dH₂O

Der Restriktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert und das Ergebnis anschließend mittels eines Agarosegels überprüft.

3.1.4.1 Partieller Restriktionsverdau

Bei einer partiellen Restriktion wird mit einem geringer konzentrierten Enzym verdaut und die Reaktion nach unterschiedlichen Reaktionszeiten abgestoppt. Da durch die kürzeren Reaktionszeiten nicht alle Schnittstellen sofort vom Enzym erkannt werden, erhält man für jeden nach einer bestimmten Zeit abgestoppten Reaktionsansatz Fragmente unterschiedlicher Größe. Diese Art der Restriktion wird genutzt, wenn die für eine Klonierung benötigte Schnittstelle zum Beispiel mehrmals im Insert vorkommt.

| | | |
|---------------------|--------------------------|--|
| Restriktionsansatz: | 3 µl Plasmid | 1 µl Enzym 2 (1:10 Verdünnung) |
| | 1 µl Enzym 1 | 1 µl 10 x Puffer |
| | 1 µl 10 x Puffer | 8 µl dH ₂ O |
| | 0,5 µl RNase | |
| | 4,5 µl dH ₂ O | → 1h 37°C |
| | | → 15 min 65°C (Inaktivierung nach verschiedenen Zeitpunkten) |
| | → 1h 37°C | |
| | → 15 min 65°C | |

3.1.5 Ligation

Mit Hilfe der Ligation können DNA-Fragmente und Plasmide, die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, zusammengefügt werden. Diese Reaktion wird von DNA-Ligasen katalysiert, die Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3' Hydroxyende und dem 5' Phosphatende der Fragmente bilden.

Ligationsansatz: 6 µl Insert
 2 µl linearisiertes Plasmid
 1 µl Ligase
 1 µl 10 x Reaktionspuffer

Der Ansatz wurde für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.1.6 Auftrennung von Nukleinsäuren

3.1.6.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA

Um DNA-Fragmente nach Größe elektrophoretisch aufzutrennen, wurden Agarosegele genutzt. Für die Herstellung eines 1%-igen Gels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Zur Detektion der DNA wurde 1 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben. Die Proben wurden mit 4 µl 6 x Ladepuffer pro 20 µl Probenvolumen versehen und zusammen mit einem Marker in die Taschen des Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V in TAE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht bei 312 nm fotografiert.

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat
 1 mM EDTA

3.1.6.2 Denaturierende Agarosegele zur Auftrennung von RNA

Zur Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 10 ml 10 x FA-Puffer und 90 ml Wasser durch kurzes Aufkochen gelöst. Um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören, wurden zusätzlich 1,8 ml Formaldehyd zugegeben. Abschließend wurde die Lösung mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt. Das ausgehärtete Gel wurde mit 1 x FA-Puffer überschichtet und

für 5 min bei 100 V equilibriert. Die Proben wurden mit 5 x RNA Ladepuffer versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für drei Stunden bei 80 V.

10 x FA-Puffer: 0.1 M MOPS pH 7.0
 50 mM NaAC
 10 mM EDTA

1 x FA-Puffer: 100 ml 10 x FA-Puffer
 20 ml Formaldehyd
 880 ml Wasser

3.1.7 DNA-Elution aus Agarosegelen

Die nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente können mithilfe des *Nucleo Spin Extraction Kits* aus einem Agarosegel eluiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, gewogen und mit der doppelten Menge an Bindepuffer versetzt. Nach Auflösen der Agarose konnten die Proben auf die Säulen aufgetragen werden. Durch Zentrifugation bei 11000 x g für eine Minute wurde die DNA fest an die Säulenmatrix gebunden. Nach zweimaligem Waschen konnte die DNA mit TE-Puffer oder Wasser von der Säule eluiert und der Gehalt gemessen werden.

3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die für eine erfolgreiche Transformation benötigten Bakterienzellen mussten zuvor chemisch kompetent gemacht werden. Dazu wurden 2 ml eine Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium gegeben, die Kultur für 2-4 h bei 37°C inkubiert und die optische Dichte photometrisch bestimmt. Hierbei sollte der gemessene Wert bei 0,2-0,5 liegen. Zum Abtrennen des Mediums wurde die Kultur für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend in 25 ml kaltem Tfb1-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C wurde das Pellet in 2,25 ml kaltem Tfb2-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze zu 50 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

| | | |
|--------------|-------------------------|--------|
| TfB1-Puffer: | 10 mM CaCl ₂ | |
| | 30 mM KOAc | |
| | 50 mM MnCl ₂ | |
| | 100 mM RbCl | |
| | 15% Glycerin | pH 5.8 |

| | | |
|--------------|-------------------------|--------|
| TfB2-Puffer: | 10 mM MOPS | |
| | 10 mM RbCl | |
| | 75 mM CaCl ₂ | |
| | 15% Glycerin | pH 6.8 |

3.1.9 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme von Fremd-DNA aus einer Lösung in die Bakterienzelle. Dazu wird ein Aliquot kompeteter *E. coli* Zellen (TOP10, Origami, M15) auf Eis aufgetaut und mit 10 µl eines Ligationsansatzes oder mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurden die Bakterien für 60 sek bei 42°C inkubiert. Dieser Hitzeschock führt zur Aufnahme der Fremd-DNA. Die transformierten Bakterien wurden mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika versetzt und bei 750 rpm für 1h unter Schütteln inkubiert. Jeweils 150 µl und 300 µl der Bakteriensuspension wurden auf entsprechende LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.10 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Zur Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen wurden 2 ml einer frischen Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium mit Rifampicin und Gentamycin gegeben und für 3-4 h bei 28°C inkubiert. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zellen 20 min bei 4°C zentrifugiert und das Bakterienpellet in 5 ml kaltem TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml LB-Medium resuspendiert, zu 500 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

| | | |
|------------|----------------|--------|
| TE-Puffer: | 10 mM Tris-HCl | |
| | 1 mM EDTA | pH 7.4 |

3.1.11 Transformation kompetenter *A. tumefaciens* Zellen

Zur Transformation von *A. tumefaciens* Zellen (GV3101 oder LBA4404) wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis, 5 min in flüssigem Stickstoff und 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotika versetzt. Nach 4-stündiger Kultivierung der Zellen unter Schütteln wurden Aliquots von 200 µl auf LB-Agarplatten zur Selektion ausplattiert.

Eine weitere Methode zur Transformation von *A. tumefaciens* Zellen ist die Elektroporation. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgt hierbei durch einen elektrischen Impuls. 50µl Zellen wurden mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt, in eine vorgekühlte Küvette überführt und bei einer Spannung von 2,5 kV und Pulsdauer von 5 msek transformiert. Aliquots der transformierten Bakterien wurden zur Selektion auf LB-Agarplatten ausplattiert und für 3-4 Tage bei 28°C inkubiert.

3.1.12 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion können beliebig große DNA-Fragmente schnell und einfach vermehrt werden. Unter Verwendung genspezifischer Primer und einer DNA-Polymerase werden identische Kopien der Template-DNA angefertigt.

| | |
|-------------|----------------------------|
| PCR-Ansatz: | 5 µl 10 x Taqpuffer |
| | 4 µl MgCl ₂ |
| | 4 µl dNTP's |
| | 1 µl Primer forward |
| | 1 µl Primer reverse |
| | 1 µl DNA-Template (1-5 ng) |
| | 33 µl dH ₂ O |
| | 1µl Taq-Polymerase |

Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung der DNA, die Auftrennung des Doppelstrangs durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen. Dies geschieht bei einer Temperatur von 94°C. Nun können die genspezifischen Primer an die als Einzelstränge vorliegende DNA binden. Dieser als „Annealing“ bezeichnete Schritt findet bei Temperaturen von 50°C-60°C statt, je nach Schmelztemperatur der Primer. Anschließend werden die Einzelstränge durch die DNA-Polymerase verlängert, dies erfolgt bei einer Temperatur von 72°C, welche das Temperaturoptimum der Polymerase darstellt. Für die Elongation eines Fragments von 1000

bp wird die Reaktion für 1 min durchgeführt. Bei größeren Fragmenten muss die Reaktionszeit erhöht werden. Diese drei Zyklen werden 20-30 mal wiederholt, wobei jeder neu synthetisierte Strang als Template für die nächste Kopie dient.

| | | | | |
|-------------|---------------|-------------|---|----------------|
| PCR-Zyklen: | Denaturierung | <u>94°C</u> | - | <u>5 min</u> |
| | Denaturierung | 94°C | - | 50 sek |
| | Annealing | 50-60°C | - | 45 sek |
| | Elongation | <u>72°C</u> | - | <u>1-3 min</u> |
| | Elongation | 72°C | - | 3 min |

3.1.12.1 Colony Screening

Das PCR-Colony-Screening wird zur Identifizierung von transgenen Bakterienkolonien genutzt. Unter Verwendung genspezifischer Primer können die von den Bakterien aufgenommenen Plasmide amplifiziert und nach einer Gelelektrophorese unter UV-Licht nachgewiesen werden. Mit dieser Methode lassen sich nicht transformierte von transformierten Bakterien unterscheiden. Die Kolonien wurden jeweils in 20 µl Wasser aufgenommen und resuspendiert. 10 µl der Suspensionen wurden mit 10 µl Mastermix in ein PCR-Gefäß pipettiert und im Master-Cycler amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte über eine Gelelektrophorese detektiert.

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| Mastermix für 10 Reaktionen: | 20 µl Taqpuffer |
| | 16 µl MgCl ₂ |
| | 16 µl dNTP's |
| | 2 µl Primer forward |
| | 2 µl Primer reverse |
| | 42 µl dH ₂ O |
| | 2 µl Taq-Polymerase |

3.1.12.2 Herstellung DIG-dUTP markierter Sonden

DNA-Fragmente, die für eine Hybridisierung mit komplementären Nukleinsäuren benötigt wurden, mussten zuvor mit Digoxigenin markiert werden, um später detektiert zu werden. Die Markierung erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion unter Verwendung des *PCR DIG Probe Synthesis Kits*.

PCR-Ansatz:

- 5 µl DIG-Puffer
- 5 µl DIG-dNTPs
- 1 µl Primer reverse (10 mM)
- 1 µl Primer forward (10 mM)
- 1 µl Template (1-5 ng)
- 0,75 ml DIG-Polymerase
- 36,25 µl Wasser

Das DNA-Template wurde amplifiziert und dabei mit Digoxigenin markiert. Nach erfolgter Gelelektrophorese konnte das Ergebnis unter UV-Licht überprüft werden. Zum Vergleich wurde ebenso ein Reaktionsansatz ohne DIG-dNTP's durchgeführt. Da das mit Digoxigenin markierte Fragment ca. 20 – 30% größer ist, konnte anhand dieses Größenunterschiedes der erfolgreiche Einbau überprüft werden.

3.1.13 Transfertechniken

3.1.13.1 Northern Blot

Der Northern Blot dient zum Nachweis der Genexpression in Pflanzen auf transkriptioneller Ebene. Dabei werden spezifische RNA-Fragmente durch Hybridisierung mit komplementären Sonden nachgewiesen.

Ein denaturierendes Agarosegel wurde wie in 3.1.6.2 beschrieben hergestellt und mit 5 µg RNA beladen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit 10 x SSC-Puffer gespült, um Reste an Formaldehyd zu entfernen. Der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran durch Kapillarkräfte erfolgte in 10 x SSC-Puffer über Nacht. Dazu wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf zwei Lagen Filterpapier gelegt, die in den Transferpuffer eintauchten. Die Nylonmembran wurde auf das Gel gelegt, danach folgte ein 10 cm hoher Stapel saugfähiges Papier. Um einen optimalen Transfer zu gewährleisten, wurde der Blot während der Transferzeit von 16-18 h mit einem Gewicht beschwert. Am folgenden Tag wurde die Membran in Methylenblaulösung angefärbt und zum kovalenten Binden der RNA für 2 min im Crosslinker inkubiert. Die nachfolgende Hybridisierung stellt einen Vorgang dar, bei dem sich einzelsträngige Nukleinsäuren mit homologen Bereichen paaren. In diesem Fall geschieht das mit einer Sonde, die komplementär zu einer bestimmten Sequenz ist und mit Digoxigenin markiert wurde. Dazu wurde die Membran in 8 ml Dig easy hyb Hybridisierungspuffer für drei Stunden bei 50°C prähybridisiert. Die Sonde wurde ebenfalls mit Puffer versetzt, bei 100°C für 10 min denaturiert und zugegeben. Die Hybridisierung

erfolgte bei 50°C über Nacht im Rotor. Die Membran wurde dann zuerst dreimal mit Waschpuffer 1 für je 15 min bei Raumtemperatur gewaschen, danach mit Waschpuffer 2 für je 15 min bei 62°C. Durch diese Waschschrte wurde nicht gebundene DIG-markierte DNA von der Membran entfernt. Die Membran wurde für 5 min in DIG-Waschpuffer equilibriert und anschließend bei Raumtemperatur für 1h in DIG-Blockierungslösung inkubiert. 1 µl des Antikörpers DIG-AP, ein Fab-Fragment, das an Digoxigenin-markierte Bereiche bindet, wurde zugegeben und die Lösung für weitere 30 min inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen der Membran für je 15 min in DIG-Waschpuffer entfernt.

Methylenblaulösung: 0.3 M NaAc (pH 5.2)
 0,25% Methylenblau

Hybridisierungspuffer: DIG easy hyb

Waschpuffer 1: 2 x SSC-Puffer
 0,1% SDS

Waschpuffer 2: 0.5 x SSC-Puffer
 0,1% SDS

DIG-Waschpuffer: 100 mM Maleinsäure (pH 7.5)
 150 mM NaCl
 0,3% Tween

DIG-Blockierungslösung: 1 ml 10 x Maleinsäure (pH 7.5)
 1 ml Blocking reagent
 8 ml Wasser

Zur Detektion wurde die Membran für 5 min in 1 x DIG-Detektionspuffer equilibriert, auf Frischhaltefolie gelegt und mit dem Substrat CDP-Star (10 µl CDP + 990 µl Detektionspuffer) benetzt. Das zuvor gebundene Fab-Fragment ist an eine alkalische Phosphatase gekoppelt, die zur Dephosphorylierung des CDP-Substrates und somit zu einem Produkt führt, das Chemilumineszenz zeigt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser je nach Signalintensität nach 10 min, 30 min oder 60 min entwickelt.

DIG-Detektionspuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 9.5); 100mM NaCl

3.1.13.2 Southern Blot

Der Southern Transfer (Southern Blot) wird angewandt, um spezifische Restriktionsfragmente genomischer DNA nachzuweisen. Zunächst wurde die isolierte DNA (2 µg) für mindestens 14h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *BamHI* verdaut und mittels Agarosegel aufgetrennt. Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurde das Gel für 30 min in Denaturierungslösung inkubiert. Im Anschluß wurde das Gel 2 x 30 min in Neutralisationslösung inkubiert und 10 min in Transferpuffer equilibriert. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf zwei Lagen Filterpapier gelegt, welches in den Transferpuffer (10 x SSC) eintauchte. Zum Transfer der DNA über Nacht wurden eine Nylonmembran sowie ein 10 cm hoher Stapel Papier, der mit einem Gewicht beschwert wurde, auf das Gel gelegt. Am folgenden Tag wurde die Membran zum kovalenten Binden der DNA für 2 min im Crosslinker inkubiert und für 2 h in DIG easy hyb Puffer bei 42°C prähybridisiert. Die für eine Hybridisierung benötigte Sonde wurde in 100 µl DIG easy hyb für 10 min bei 95°C denaturiert und zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Das Waschen der Membran sowie die Detektion erfolgten analog zur Durchführung des Northern Transfers.

Denaturierungslösung: 1.5 M NaCl
 0.5 M NaOH

Neutralisationslösung: 1.5 M NaCl
 0.5 M Tris-HCl pH 7.4

Transferpuffer (10 x SSC): 1.5 M NaCl
 0.15 M Natriumcitrat

3.1.14 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA, pflanzlicher DNA oder RNA wurde das Gerät *nanodrop* der Firma Peqlab verwendet, welches von der Arbeitsgruppe Thiel zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.15 Fertigung von Glycerolstocks

Zur längerfristigen Aufbewahrung rekombinanter Bakterienklone wurden 500 µl einer 50%igen Glycerol-Lösung mit 500 µl der jeweiligen Kultur versetzt und bei -80°C gelagert.

3.2 Isolierung intakter Chloroplasten

Zur Untersuchung der Lokalisation der exprimierten Proteine wurden intakte Chloroplasten aus transgenem Pflanzenmaterial isoliert. Die Isolierung erfolgte nach Protokollen von Block *et al.* (1983) und Ralph Bock (1998). Das verwendete Pflanzenmaterial wurde vor Versuchsbeginn für 2-3 Tage im Dunkeln gehalten.

Ca. 40 g Pflanzenmaterial wurden geerntet, die Mittelrippe entfernt und in 1 cm dünne Streifen geschnitten. Das Blattmaterial wurde zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend in einem Mixer mit 250 ml Grindingpuffer für 5 sek bei maximaler Geschwindigkeit und für 5 sek bei minimaler Geschwindigkeit homogenisiert. Nach Abfiltrieren der Suspension durch zwei Schichten Miracloth wurde das Filtrat für 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Chloroplastenpellet wurde in 3 ml Grindingpuffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf zwei gekühlte Percoll-Gradienten aufgetragen und bei 5600 x g für 10 min zentrifugiert. Für die Percoll-Gradienten wurden 3 ml einer 80%-igen Percoll-Lösung mit 7,5 ml einer 40%-igen Percoll-Lösung vorsichtig überschichtet. Intakte Chloroplasten, die sich an der Interphase der Percoll-Lösungen sammelten, wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze gesammelt, zweimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und für weitere Versuche im Kühlschrank aufbewahrt.

5 x Grindingpuffer: 1.65 M Sorbitol
 10 mM EDTA
 5 mM MgCl₂
 5 mM 2-Mercaptoethanol, pH 6.8

Grindingpuffer: 200 ml 5 x Puffer
 10 ml Isoascorbatpuffer
 790 ml dH₂O

Isoascorbatpuffer: 500 mM Isoascorbat
 50 mM HEPES

Waschpuffer: 300 mM Mannitol
10 mM MOPS, pH 7.8

40%-Percoll: 300 mM Mannitol
10 mM Tricin
4,8 ml Percoll-Lösung
ad 6 ml dH₂O

80%-Percoll: 300 mM Mannitol
10 mM Tricin
6 ml Percoll-Lösung
ad 15 ml dH₂O

3.3 Isolierung stoffwechselaktiver Protoplasten

Die für eine Isotopenmarkierung benötigten Protoplasten wurden zuvor aus transgenem Blattmaterial isoliert. Dazu wurden ca. 20 cm² große Blätter in eine Petrischale gelegt, die Blattoberseite mit einem Skalpell kammförmig angeschnitten und mit 20 ml Enzymlösung überschichtet. Nach einer Inkubation bei 26°C über Nacht konnten die Protoplasten durch vorsichtiges Schwenken aus der Blattstruktur gelöst werden. Die Protoplastenlösung wurde dann durch eine Schicht Miracloth in 50 ml Falcons filtriert. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur sammelten sich die intakten Protoplasten in der oberen Schicht der Suspension und wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Zentrifugegefäß überführt. Die Protoplasten wurden in 10 ml Waschpuffer aufgenommen und für 5 min bei 100 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde das Protoplastenpellet in 500 µl MSTM-Puffer resuspendiert.

Enzymlösung: 0,25 g Cellulase/100 ml MSTS-Puffer
0,1 g Macerozym/100 ml MSTS-Puffer

MSTS-Puffer: 4,41 g MS
20 µl 2,4-D
1 g MES
136,9 g Saccharose
ad 1000 ml dH₂O, pH 5.7

Waschpuffer: 18,4 g $\text{CaCl}_2 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$
9 g NaCl
0,4 g KCl
1 g Glucose
0,1 g MES
ad 1000 ml dH_2O , pH 5.8

MSTM-Puffer: 4,41 g MS
100 μl 2,4-D
1 g MES
30 g Saccharose
73 g Mannitol
ad 1000 ml dH_2O , pH 5.7

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinisolierung aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und homogenisiert. Die Proben wurden mit 300 μl 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt. Nach Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur wurden 20 μl Aliquots entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgtem Western Blot konnte so das gewünschte Protein durch Verwendung von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

2 x SDS-Probenpuffer: 0.125 M Tris-HCl pH 6.8
20% Glycerin
4% SDS
0,2% Bromphenolblau

3.4.2 Proteinisolierung aus Bakterien

Die Proteinisolierung aus Bakterien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Pierce und unter Verwendung von Säulenmaterial des *Protino His-Tag Purification Kits*.

3 ml der am Tag zuvor induzierten Bakterienkulturen wurden pelletiert, in 150 µl kaltem Waschpuffer gelöst und erneut bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde wieder in 150 µl kaltem Waschpuffer gelöst. Dieser wurde zuvor mit 1 mM PMSF versetzt um den Abbau von Proteinen bei der Aufarbeitung zu verhindern. Anschließend wurde die Lösung mit etwas Quarzsand versetzt. Zum Aufschluss der Bakterienzellen wurde die Mischung 5 x für 1 min gemixt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 3500 x g wurde der klare Überstand auf 20 µl des *Protino* Säulenmaterials gegeben und zur Bindung der Proteine über das His-Tag an das Säulenmaterial für 30 min unter Schütteln inkubiert. Der Überstand, in dem sich nicht gebundene Proteine befanden, wurde verworfen. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit 200 µl LEW-Puffer gewaschen, zur Elution der Proteine mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt. 20 µl des Überstandes wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8
 100 mM NaCl
 1 mM PMSF

LEW-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄
 300 mM NaCl
 ad 1000 ml H₂O, pH 8

3.4.2.1 Membranproteinisolierung aus Bakterien

Zur Isolierung von Gesamtprotein und anschließender Trennung der Membranproteine von cytosolischen Proteinen wurde die Methode von Bordier angewandt (Bordier, C., 1981). Das Prinzip dieser Methode ist die Lösung der hydrophoben Membranproteine unter Verwendung bestimmter Detergenzien und die anschließende Ausfällung der in Mizellen eingeschlossenen Proteine durch Erwärmung (Biospektrum: Methoden und Anwendungen). Wie zuvor in 3.4.2 beschrieben, wurden 3 ml einer am Tag zuvor induzierten Bakterienkultur pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in 150 µl kaltem Waschpuffer gelöst und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 150 µl des mit 1 mM PMSF versetzten Waschpuffers resuspendiert und eine Spatelspitze Quarzsand wurde zugegeben. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Ansätze 5 x 1 min gemixt, Zelltrümmer und Quarzsand durch Zentrifugation bei 4°C und 3500 x g entfernt und der klare Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen. Anschließend wurden 200 µl des Proteinextraktes mit 2 µl Triton X 114 versetzt und zu einer bereits vorbereiteten Zuckerlösung pipettiert. Nach Inkubation des Ansatzes für 3 min bei 30°C und Zentrifugation für 3 min bei 300 x g wurde

die obere Phase, die cytosolische Fraktion, in ein neues Gefäß überführt und erneut auf eine Zuckerlösung pipettiert. Die untere Triton X 114 Phase, welche die in Mizellen angereicherten Membranproteine enthielt, wurde zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die cytosolische, mit Zuckerlösung versetzte Fraktion wurde wieder bei 30°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die entstandenen zwei Phasen wurden erneut voneinander getrennt. 20 µl der Membran- sowie der cytosolischen Fraktion konnten nun für eine SDS-PAGE verwendet werden.

Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8
 100 mM NaCl
 1 mM PMSF

Zuckerlösung: 6% Zucker
 10 mM Tris-HCl, pH 7.4
 150 mM NaCl
 0,06% Triton X 114

3.4.3 SDS-Page

Zur Identifizierung von Proteingemischen und zum Nachweis einzelner Proteine, wird das Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewandt. Das dabei verwendete SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet an die Proteine und zerstört deren Quartärstruktur. Die Auftrennung der Proteine wird durch den Acrylamidanteil im Gel bestimmt. Steigt die Acrylamidmenge, nimmt die Größe der Poren zu (Maniatis *et al.*, 1989). Die SDS-Protein-Komplexe wandern dann im elektrischen Feld unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffers (Laemmli, 1970) zum Pluspol und werden aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt. Das SDS-Gel besteht aus einem Trenngel, dem ein Sammelgel vorgeschaltet ist. 12,5%-ige Gele wurden wie folgt hergestellt.

| | | | |
|-----------|-------------------------|------------|--------------------------|
| Trenngel: | 4,75 ml Acrylamid | Sammelgel: | 0,88 ml Acrylamid |
| | 2,85 ml Trenngelpuffer | | 1,66 ml Sammelgelpuffer |
| | 3,1 ml H ₂ O | | 4,06 ml H ₂ O |
| | 113 µl 10% SDS | | 66 µl 10% SDS |
| | 56,5 µl APS | | 50 µl APS |
| | 50 µl TEMED | | 50 µl TEMED |

Aliquots der Proteinproben wurden mit 5 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde für 1h bei 40 V und für weitere 2h bei 100V in 1 x SDS-Laufpuffer durchgeführt.

| | |
|-----------------------|---|
| Trenngelpuffer: | 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 |
| Sammelgelpuffer: | 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 |
| 5 x SDS-Probenpuffer: | 250 mM Tris-HCl, pH 6.8 10% SDS 0,5% Bromphenolblau 50% Glycerol |
| 1 x SDS-Laufpuffer: | 25 mM Tris-HCl, pH 8.3 192 mM Glycin 0,1% SDS |

3.4.4 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese von dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde das Gel zuvor für 10 min in 1 x Transferpuffer equilibriert. Das Gel wurde dann auf eine mit Methanol befeuchtete Membran gelegt und der Zusammenbau auf beiden Seiten durch mehrere Schichten Whatmanpapier und zwei Schaumstofflagen vervollständigt. Nach Einsetzen in die Tank-Blot-Apparatur wurde eine Spannung angelegt, sodass die Proteine Richtung Anode wandern und auf der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden. Der Transfer erfolgte in 1 x Transferpuffer für 1h bei 100 V. Anschließend wurde die Membran über Nacht in Magermilchlösung bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen und somit die unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern.

Am folgenden Tag wurde die Membran in 10 ml 1 x PBST zusammen mit dem Primärantikörper für 1h im Rotor inkubiert. Nach drei Waschschritten in 1 x PBST für 10 min wurde der Sekundärantikörper in 10 ml 1 x PBST gelöst und die Membran für eine weitere Stunde im Rotor inkubiert. Die Waschschrritte wurden erneut wiederholt, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde mit 1 ml SuperSignal benetzt und unter Frischhaltefolie für 5 min inkubiert. Durch eine an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase wird das im SuperSignal enthaltene Luminol oxidiert. Es findet eine

Chemilumineszenz-Reaktion statt, die dann mittels Röntgenfilmen detektiert werden kann. Die Röntgenfilme wurden nach 5 min, 30 min oder 60 min, je nach Signalstärke entwickelt.

| | |
|---------------------|---|
| 1 x Transferpuffer: | 25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% MeOH |
| Magermilchlösung: | 5% Magermilchpulver 1 x PBST-Puffer |
| 10x PBS-Puffer: | 23 mM Na ₂ HPO ₄ 17 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM NaCl, pH 7.2 |
| 1 x PBST-Puffer: | 1 x PBS-Puffer 0,1% Tween 20 |

3.4.5 Färbung von SDS-Gelen

Zum direkten Vergleich wurde parallel zum Western Blot ein SDS-Gel angefärbt. Dieses wurde nach der Elektrophorese zuerst 2 x 10 min mit Wasser gewaschen und anschließend über Nacht in Coomassie-Brilliant-Blue 250 inkubiert. Der Farbstoff lagert sich an die ausgefällten Proteine an, färbt diese blau und fixiert sie gleichzeitig. Zur Entfernung der Hintergrundfärbung wurde das Gel am nächsten Tag mehrmals mit Wasser gewaschen und konnte dann unter Vakuum getrocknet werden.

3.5 Inkorporation von [9,10-³H] Palmitinsäure

3.5.1 Vorbereitung der [9,10-³H] Palmitinsäure

Pro Experiment wurden etwa 200 µCi [9,10-³H] Palmitinsäure benötigt. Da diese in Ethanol gelöst vorlag, musste das entsprechende Volumen Ethanol in der Vakuumzentrifuge abgeblasen werden. Wurde die Palmitinsäure für eine Fütterung stoffwechselaktiver Protoplasten verwendet, wurde der Rückstand in 2 µl DMSO gelöst und die Lösung mit 6 µl MSTM-Puffer versetzt. Zur Fütterung bakterieller Zellen, die sich in der exponentiellen

Wachstumsphase befanden, wurde der Rückstand an Palmitinsäure in 2 µl DMSO aufgenommen und zusätzlich mit 8 µl LB-Medium versetzt.

3.5.2 *In vivo*-Isotopenmarkierung stoffwechselaktiver Protoplasten

Zur radioaktiven Markierung von Proteinen wurde eine *in vivo*-Isotopenmarkierung durchgeführt. Dazu wurden 200 µl zuvor isolierter Protoplasten in MSTM-Puffer benötigt. Pro Experiment wurden 200 µCi [9,10-3H] Palmitinsäure in 2 µl DMSO gelöst, mit 6 µl MSTM-Puffer versetzt und zu der Protoplastenlösung zugegeben. Zur Inkorporation der Palmitinsäure wurden die Proben für 3h bei 500 rpm inkubiert und anschließend über Nacht zur Lyse der Protoplasten bei -20°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Protoplasten mit 200 µl Bindepuffer, der 1% Triton X 100 enthielt, versetzt und zur Abtrennung zellulärer Bestandteile zentrifugiert. Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus dem Lysat wurde der Überstand auf 20 mg Protino-Säulenmaterial gegeben. Die Bindung der rekombinanten Proteine an das Säulenmaterial erfolgte durch eine 30 minütige Inkubation. Der Überstand wurde verworfen. Das Säulenmaterial wurde mit 200 µl 1 x LEW-Puffer versetzt, 2 min inkubiert und der Überstand wieder verworfen. Der Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur Elution der Proteine wurden 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer auf das Säulenmaterial gegeben. Nach Erhitzen bei 95°C für 10 min wurde der Überstand auf ein 10%-iges Bis-Tris-Fertiggel aufgetragen und die Proteine für 2 h bei 120 V aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel zuerst für 30 min in Fixierlösung und danach für 30 min in Verstärkerlösung (Amplify-Lösung) inkubiert. Nach Trocknung des Gels unter Vakuum wurde ein vorbelichteter Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei -80°C für etwa 3 Wochen inkubiert.

| | |
|---------------|--|
| Fixierlösung: | 25% (v/v) 10% Essigsäure (v/v) 65% H ₂ O (v/v) |
| LEW-Puffer: | 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl ad 1000 ml H ₂ O, pH 8 |
| Bindepuffer: | 100 mM HEPES 10 mM Imidazol |

3.5.3 *In vivo*-Isotopenmarkierung bakterieller Zellen

Zur radioaktiven Markierung rekombinanter, in Bakterien exprimierter Proteine, wurden die entsprechenden Bakterienkulturen mit 10 µl der zuvor vorbereiteten [9,10-³H] Palmitinsäure-Lösung versetzt und zur Inkorporation der Palmitinsäure für 3 h unter Schütteln inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakterien und die anschließende selektive Aufreinigung der Proteine erfolgten wie unter 3.4.2 beschrieben durch Verwendung des Säulenmaterials des *Protino His-Tag Purification Kits*. Die Elution der Proteine von der Säulenmatrix erfolgte durch Zugabe von 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer. Die Eluate wurden auf ein 10%-iges Bis-Tris-Fertiggel aufgetragen und die Proteine bei 120 V aufgetrennt. Nach Inkubation des Gels in Fixier- und Verstärkerlösung wurde dieses unter Vakuum getrocknet, ein vorbelichteter Röntgenfilm aufgelegt und für 3 Wochen bei -80°C gelagert.

3.6 Transformation von Pflanzen

3.6.1 Chloroplastentransformation von *Nicotiana tabacum*

Chloroplasten sind semiautonome Organellen, die aus prokaryotischen Vorläufern der Cyanobakterien entstanden sind. Chloroplasten besitzen ein eigenes zirkuläres Genom von etwa 120-180 kb und eine eigene Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Sie sind zudem polyploid, das heißt es liegen bis zu 10000 Moleküle plastidäre DNA in einer Mesophyllzelle vor.

Sanford *et al.* machten sich die Vorteile der Chloroplasten zu Nutze und entwickelten 1988 eine Technik zur Transformation von Chloroplasten. Diese wurde das erste Mal erfolgreich bei der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist das Einbringen von Fremd-DNA, die auf Gold- oder Wolframpartikeln fixiert ist und durch hohen Druck in die Zelle gebracht wird. Die Integration der Fremd-DNA erfolgt hierbei durch homologe Rekombination. Nach der Integration enthält die Zelllinie eine Mixpopulation von Wildtypgenomen und transformierten Genomen. Diese heteroplastischen Zellen sind in der Regel sehr instabil, sodass durch hohen selektiven Druck das Wildtypgenom vollständig verdrängt wird. Homoplastische Zelllinien erhält man etwa nach Erzeugung von 2 bis 4 Generationen.

Goldpartikelpräparation

Für die Transformation von 10 Blättern von *N. tabacum* wurden 2 mg Goldpartikel (Micron Gold, Bio Rad) in 100 µl Ethanol suspendiert, für 1 min auf höchster Stufe gemixt und bei 4°C für 1 sek zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Partikel in 1 ml Wasser gelöst und erneut gemixt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Goldpartikel wurden in 250 µl steriles Wasser aufgenommen. Im Anschluss wurden 25 µg DNA, 250 µl CaCl₂ und 50 µl Spermidin zugegeben. Die Mischung wurde für 10 min auf Eis inkubiert und dabei jede Minute gemixt. Nach Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand verworfen und die Partikel mit 600 µl Ethanol gewaschen. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Partikeln konnten nun in 65 µl Ethanol resuspendiert werden. Pro Blatt und Schuss wurden 6 µl der präparierten Goldpartikel verwendet.

Transformation

Vor Transformationsbeginn wurden alle benötigten Arbeitsgeräte und Materialien mit Isopropanol desinfiziert. 6 µl der Goldpartikelsuspension wurden auf einen Macrocarrier pipettiert. Rupture disc und Macrocarrier wurden in die Gene Gun eingesetzt. Ein Tabakblatt wurde mit der Unterseite nach oben in eine Petrischale gelegt und unter den Macrocarrier gestellt. Durch Anlegen eines Vakuums von 27 inch Hg wurde ein Heliumüberdruck erzeugt. Der Beschuss des Blattes erfolgte bei einem Druck von 1100 psi. Zur Regeneration wurden die Blätter für 2 Tage unter Dauerlicht bei 26°C inkubiert, anschließend in kleine Stücke geschnitten und zur Selektion auf RMOP-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausgebracht. Entstandene Kalli wurden auf frisches Medium überführt und solange kultiviert, bis neue Pflanzen aus den Kalluskulturen entstanden.

3.6.2 Kerntransformation von *Nicotiana tabacum*

Bereits in den 70er Jahren wurde eine Methode entwickelt um Fremd-DNA stabil in das Kerngenom von Pflanzen zu integrieren. Dabei fungiert das Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* als Überträger der DNA. *A. tumefaciens* ist ein Bodenbakterium, das ein Ti-Plasmid, ein tumorinduzierendes Plasmid, trägt und die Pflanze befallen und infizieren kann. Durch Rekombination werden Teile des Ti-Plasmids in das Kerngenom der Pflanze integriert. Als Folge einer gesteigerten Synthese von Kohlenhydraten und Aminosäuren bildet die Pflanze Tumore, sogenannte Wurzelhalsgallen aus. Wird das Ti-Plasmid der Agrobakterien gegen die Fremd-DNA ausgetauscht, wird diese in das Genom der Pflanze integriert, ohne

Tumore zu bilden. Die Fremd-DNA wird im Gegensatz zur Chloroplastentransformation nicht gerichtet, sondern zufällig in das Genom der Pflanze integriert.

Für die Transformation wurden Agrobakterien mit dem gewünschten Gen transformiert. Flüssigkulturen wurden angesetzt und 6 Wochen alte, klein geschnittene Blätter von *Nicotiana tabacum* wurden für 15 min in der Bakteriensuspension inkubiert. Die Blattstücke wurden mit der Unterseite nach unten auf RMOP-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gelegt und für 2 Tage unter Ausschluss von Licht inkubiert. Danach wurden die Blattstücke auf neues Medium gebracht und entstandene Kalli ebenfalls auf frisches Medium überführt.

3.6.3 Transiente Expression

Transiente Expressionssysteme basieren auf Pflanzenviren, zum Beispiel dem Tabakmosaikvirus, bei denen Gene, die für die Capsidsynthese kodieren, gegen andere Gene ausgetauscht werden. Die Firma ICON Genetics entwickelte ein sehr effizientes System der transienten Expression. Dabei werden verschiedene Pro-Vektor-Module innerhalb der Pflanzenzelle zu einem stabilen viralen Vektor zusammengefügt. Das 5'-Pro-Vektor-Modul setzt sich aus einem Sequenzabschnitt des viralen Vektors sowie einem Promotor zusammen. Das 3'-Pro-Vektor-Modul enthält ebenfalls einen Sequenzabschnitt des viralen Vektors sowie das gewünschte Gen. Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens*) werden mit diesen Modulen transformiert und mittels Co-Infiltration in die Pflanze eingebracht. Eine site-specific-Rekombinase, die ebenfalls infiltriert wird, verknüpft im Zellkern die beiden Module, diese werden transkribiert und prozessiert, sodass letztendlich ein funktionsfähiges Amplicon entsteht, das ins Cytosol entlassen wird (Marillonet *et al.*, 2004; 2005). Bereits nach 6-10 Tagen kann die Protein-Akkumulation nachgewiesen werden, desweiteren ist die Ausbeute an Gesamtprotein deutlich höher als bei einer Kerntransformation. Durch Modifikationen der Pro-Vektor-Module ist es ebenfalls möglich, Gene bzw. Proteine in verschiedene subzelluläre Kompartimente zu bringen. Diese variablen Module enthalten Signalsequenzen zum Transport des Proteins in den Chloroplasten oder Apoplasten.

Agrobakterien, die die entsprechenden Module besitzen, wurden zur Vermehrung über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Bakterienpellets wurden in 50 ml ICON-Puffer gelöst und die drei verschiedenen Module im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Mit einer Spritze wurde die Bakteriensuspension über die Blattunterseite in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen infiltriert. Nach 6-10 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und standen für weitere Experimente zur Verfügung.

ICON-Puffer: 10 mM MgSO₄
 10 mM MES
 ad 1000 ml H₂O

3.7 Kultivierung von Pflanzen

Zur Charakterisierung transgener Tabakpflanzen der Gattung *Nicotiana tabacum*, mussten die zur Verfügung stehenden transgenen Samen steril kultiviert werden. Dazu wurden die Samen für 30 min in Sterilisationslösung inkubiert, anschließend 4 x mit sterilem Wasser gewaschen und zur Keimung und Ausbildung von Wurzeln auf MS-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausgebracht. Die sterile Kultivierung von Pflanzen erfolgte unter Dauerlicht bei 26°C.

Pflanzen, die nach der Keimung auf Erde gebracht wurden, wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen, das heißt 14 Stunden Tag und 10 Stunden Nacht, bei 22°C kultiviert.

Sterilisationslösung: 50% Natriumhypochlorid
 50% dd H₂O
 1% Tween 20

3.8 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird angewandt, um zum Beispiel Sekundärmetabolite von Pflanzen nachzuweisen. Unterschiedlich geladene Substanzen trennen sich aufgrund der Wanderung eines Lösungsmittels durch eine stationäre Phase voneinander. In diesem Fall sollte gezeigt werden, ob in transgenen Pflanzen, welche das humane Cytochrom CYP2A6 exprimierten, die Bildung von Indican stattfand. Dazu wurden 200 mg Blattmaterial geerntet, mit 10 ml Aceton/0,5% HAc versetzt und 30 min unter ständigem Rühren extrahiert. Nach Zentrifugation wurde 1 ml des klaren Überstandes für 1-2 h bei 55°C unter Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in 50-100 µl Methanol aufgenommen. Die Auftrennung der Blattextrakte erfolgte auf DC-Kieselgel-Alufolien mit Fluoreszenzindikator. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser im Verhältnis 70:28:2. Nach Auftrennung wurde die Platte mit Ammoniak bedampft und anschließend mit 5%-iger Salzsäure besprüht.

3.9 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisation rekombinanter Proteine wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet. Da die Proteine zusätzlich YFP als Fluoreszenzmarker enthielten, konnte deren Lokalisation innerhalb der Zelle mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Hierfür wurden stoffwechselaktive Protoplasten aus transgenen *N. benthamiana* Pflanzen isoliert und in 400 µl MSTM-Puffer gelöst. 20 µl der Lösung wurden auf einen Objektträger gegeben und an einem konfokalem Mikroskop (Leica TCS SP) mit einem Wasser-Immersion-Objektiv untersucht. Bei einer Wellenlänge von 520 nm konnten die das Fusionsprotein exprimierenden Protoplasten detektiert werden. Dies geschah mit einem Argon-Ionen-Laser, der die Zelle in jeder Ebene abtastet. Die Fluoreszenzsignale wurden von einem Detektor aufgenommen und an einen Computer weitergeleitet. Mithilfe eines speziellen Bildbearbeitungsprogramms konnten aussagekräftige Bilder generiert werden.

4. Ergebnisse

4.1 Expression des humanen CYP2A6 im Chloroplastengenom

Wie zuvor in der Einleitung beschrieben konnte eine geringe Aktivität des humanen CYP2A6 bei Expression des Gens im Kern nachgewiesen werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die geringe Aktivität mit der geringen Expressionsrate im Kern zusammenhängt und eine Expression von 2A6 in den Chloroplasten zu einer gesteigerten Aktivität führen kann, da die Expressionsrate in den Chloroplasten oftmals höher ist als eine Expression im Kerngenom. Da sowohl die Synthese von Tryptophan als auch die zwischenzeitliche Bildung des Stoffwechselintermediats Indol in den Chloroplasten stattfindet, sollte untersucht werden, ob die Bildung indigoider Pigmente in den Chloroplasten möglich ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung standen initial Samen mehrerer transgener Pflanzenlinien zur Verfügung. Diese Linien wurden von H. Warzecha erzeugt und von K. Dückershoff im Rahmen ihrer Diplomarbeit auf Homoplasomie getestet.

Das in diesem Fall verwendete 2A6-Gen war das gleiche, welches auch für die in der Einleitung beschriebene Kernexpression verwendet wurde. Die durch die Klonierung bedingte Änderung der zweiten Aminosäure von Lysin zu Alanin kann in diesem Fall ein Vorteil sein, da bereits durch andere Arbeiten gezeigt werden konnte, dass eine Modifikation der ersten sieben Aminosäuren innerhalb des N-terminalen Sequenzabschnittes zu einer gesteigerten Expression in Bakterien führen kann (Barnes *et al.*, 1991).

| | |
|------------------|--|
| Endogenes CYP2A6 | MLASGMLLVALLVCLTVMVLMSVWQQRKSKGKLPPGPT.....FLPR* |
| CYP2A6 (pNT2) | MAASGMLLVALLVCLTVMVLMSVWQQRKSKGKLPPGPT.....FLPR* |

Abbildung 4.1. Vergleich der Aminosäuresequenz des nativen Cytochroms CYP2A6 und des modifizierten CYP2A6

4.1.1 Charakterisierung homoplastischer pNT2-2A6-Linien

4.1.1.1 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese

Samen der homoplastischen Linien pNT2-2A6 # 1b, # 12b1, # 14b1 und # 14-2 wurden auf Spectinomycin-haltigem Medium kultiviert und zur Keimung gebracht. Nach etwa 3 Wochen konnte Blattmaterial der Kotyledonen der Pflanzenlinien geerntet werden. Das

Vorhandensein des Transgens *CYP2A6* sollte zunächst mittels PCR nachgewiesen werden. Aus 100 mg Blattmaterial von jeweils 2 Pflanzen der oben erwähnten Linien wurde DNA isoliert und diese in einer PCR-Reaktion unter Verwendung genspezifischer Primer, die innerhalb des 2A6-Gens binden, eingesetzt. Alle getesteten Pflanzenlinien zeigten nach PCR und Gelelektrophorese eine Bande der Größe 500 bp, das heißt, alle Linien enthielten das Transgen *CYP2A6*. Nachfolgend sollte ein Northern Blot Aufschluss darüber geben, ob das eingebrachte Transgen in der Pflanze transkribiert wird. Dazu wurde aus den verschiedenen Linien RNA isoliert und diese über ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt. Die Betrachtung des Gels unter UV-Licht zeigte die erfolgreiche Auftrennung der RNA sowie die Integrität der 23S-rRNA (Abbildung 4.2A). Die RNA wurde anschließend auf eine Membran transferiert, der Nachweis des Transkripts erfolgte mit einer spezifischen, zum *CYP2A6*-Gen komplementären Sonde. Es konnte bei allen Pflanzenlinien, mit Ausnahme von Linie # 1b (1), die Bildung des Transkripts nachgewiesen werden (Abbildung 4.2B). Linie # 12b1 (1) sowie Linie # 14-2 (2) zeigten im Vergleich zu den anderen Linien eine eher geringe Transkription, dies korreliert aber mit der Signalstärke der RNA unter UV-Licht (Abbildung 4.2A) und somit mit der Konzentration an RNA der Proben nach Gelelektrophorese. RNA des Wildtyps zeigte wie erwartet kein Signal nach Hybridisierung mit der 700 bp großen 2A6-Sonde.

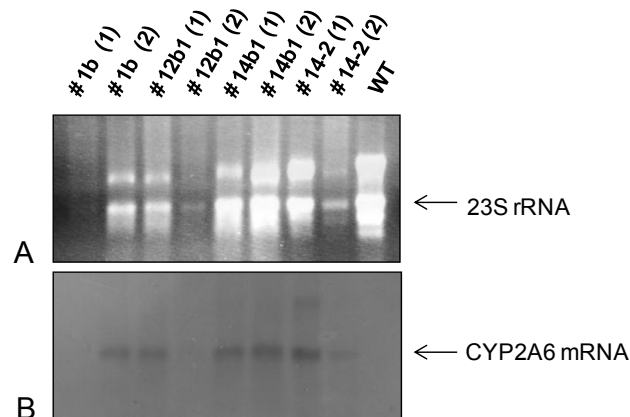


Abbildung 4.2. RNA-Blot homoplastischer pNT2-2A6-Pflanzen. A) Aufgetrennte RNA nach denaturierender Gelelektrophorese. B) Detektion der 2A6-mRNA (1500 bp) nach Hybridisierung mit einer genspezifischen 2A6-Sonde.

Da die Bildung der 2A6-RNA erfolgreich nachgewiesen werden konnte, konnte nun die Synthese des Proteins CYP2A6 in den Pflanzen untersucht werden. Dazu wurden 200 mg Blattmaterial der verschiedenen Linien entnommen, mit SDS-Probenpuffer aufgekocht, 20 µl des Überstandes auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Detektion des Proteins wurde ein monoklonaler CYP2A6-Antikörper (mouse-

anti-2A6) verwendet. Die Proteinbildung konnte bei den Linien # 14b1 (2), # 12b1 (1) sowie # 14-2 (1) nachgewiesen werden. Das nach Immunoblot detektierte Signal entsprach der relativen Molekülmasse 52000, der Masse des Proteins CYP2A6. Es konnte kein Signal für Linie # 1b (2) detektiert werden (Abbildung 4.3).

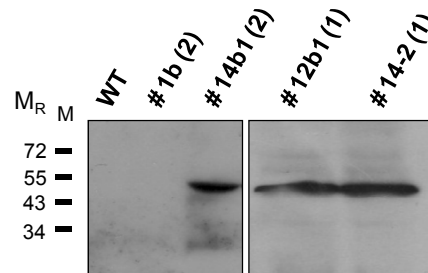


Abbildung 4.3. Immunoblot transgener pNT2-2A6-Pflanzen. Blattextrakte der Linien # 1b (2), # 12b1 (1), # 14b1 (2) und # 14-2 (1) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion des Proteins CYP2A6 erfolgte unter Verwendung eines spezifischen 2A6-Antikörpers. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

4.1.1.2 Aktivitätsnachweis des Proteins CYP2A6

Da die Synthese des Proteins CYP2A6 erfolgreich in den Pflanzenlinien pNT2-2A6 # 14b1, # 12b1 und # 14-2 nachgewiesen werden konnte, sollte nun die Funktionalität bzw. Aktivität des Proteins untersucht werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Kerntransformatanten, die das Cytochrom CYP2A6 exprimierten, in der Lage waren Indican zu bilden, war dies ein Hinweis darauf, dass eine endogene, ER-lokalisierte NADPH-Reduktase als Elektronendonator fungiert. Die Möglichkeit der Indicanbildung in diesen Linien ist in diesem Fall eher unwahrscheinlich, da in nativen Chloroplasten kein freies Indol entsteht und damit nicht als Substrat zur Verfügung steht. Trotzdem wurden diese Linien mittels Dünnschichtchromatographie auf eventuell gebildete indigoide Pigmente getestet. Dafür wurden 200 mg Blattmaterial für eine Stunde mit Aceton extrahiert, der Überstand unter Vakuum eingedunstet und anschließend auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und getrennt. Durch das Besprühen der DC-Platte mit Salzsäure sollten nach kurzer Zeit blaue Zonen zu erkennen sein, da sich bei dieser Reaktion der Zuckerrest des Indicans abspaltet und das so entstandene Indoxyl unter Luftsauerstoff mit einem weiteren Molekül Indoxyl zum Farbstoff Indigo dimerisieren kann. Wie zuvor vermutet, konnte bei keiner der getesteten

Proben eine blaue Bande detektiert werden. Eine blaue Indigo-Zone konnte ausschließlich für den Standard Indican nach Besprühen mit Salzsäure detektiert werden (Abbildung 4.4).

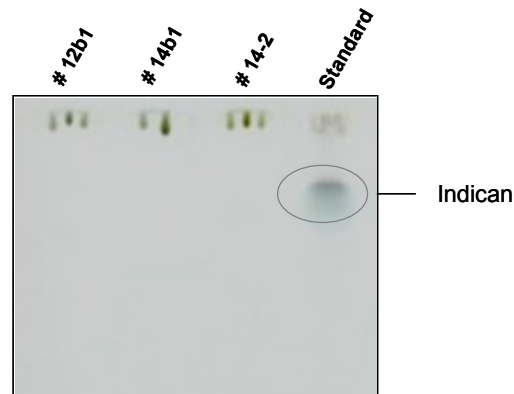


Abbildung 4.4. Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nach Extraktion von 200 mg Blattmaterial der pNT2-2A6-Linien mit Aceton. Nach Besprühen der Kieselgelplatte mit Salzsäure konnte ausschließlich für den Standard Indican eine blaue Indigo-Zone detektiert werden.

4.1.1.3 Aktivitätsnachweis des Proteins CYP2A6 nach Indol-Zugabe

Da in den Pflanzenlinien pNT2-2A6 wie vermutet keine Indicanbildung detektiert werden konnte, da kein freies Indol zur Verfügung stand, sollte den Pflanzen in einem weiteren Versuch Indol über das Medium zugeführt werden. Falls das gebildete CYP2A6 in den Pflanzen aktiv ist, sollte das zugegebene Indol hydroxyliert werden und somit auch die Bildung von indigoiden Pigmenten nachweisbar sein.

Indol ist eine sehr flüchtige Substanz und ließ sich nicht zusammen mit dem Medium sterilisieren oder sterilfiltrieren. Um trotzdem eine Zugabe zu den Pflanzen und somit die Aufnahme zu erreichen, wurden etwa 500 mg des Feststoffes Indol (2-3 Körnchen) auf das Medium gegeben, mit der Absicht, dass durch die Diffusion eine ausreichende Konzentration Indol in der Pflanze erzielt wird. Allerdings verfärbte sich das Medium bereits nach mehreren Stunden rot und der Phänotyp der Pflanzen veränderte sich. Die Pflanzen begannen zu welken und mussten somit spätestens innerhalb von zwei Tagen geerntet werden (Abbildung 4.5A). Wurde der Feststoff Indol nicht direkt auf das Medium, sondern in die Deckel der Kultivierungsgefäße „geklebt“, begannen die Pflanzen auch in diesem Fall bereits nach 1-2 Tagen zu welken. Für die Durchführung der Dünnschichtchromatographie wurde das Blattmaterial der Linien # 12b1 und # 14b1 mit Aceton extrahiert und 20 µl des in Methanol aufgenommenen Rückstandes nach Einengung unter Vakuum auf eine DC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Platte wurde mit 5%-iger Salzsäure besprüht und für eine halbe Stunde

getrocknet. Wie aus Abbildung 4.5B ersichtlich, konnten sehr schwache blaue Zonen bei beiden getesteten Linien detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das gebildete Protein CYP2A6 in aktiver Form vorliegt und somit in der Lage ist, zugeführtes Indol zu metabolisieren und zu speichern. Desweiteren ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass das gebildete Protein mit einer Tabak-spezifischen NADPH-Reduktase interagieren kann. Doch auch hier zeigte sich, dass die gebildeten Mengen an indigoiden Pigmenten im Vergleich zum Standard extrem gering waren. Dies lässt sich vermutlich mit den nachfolgenden Untersuchungen zur Expressionsrate erklären.

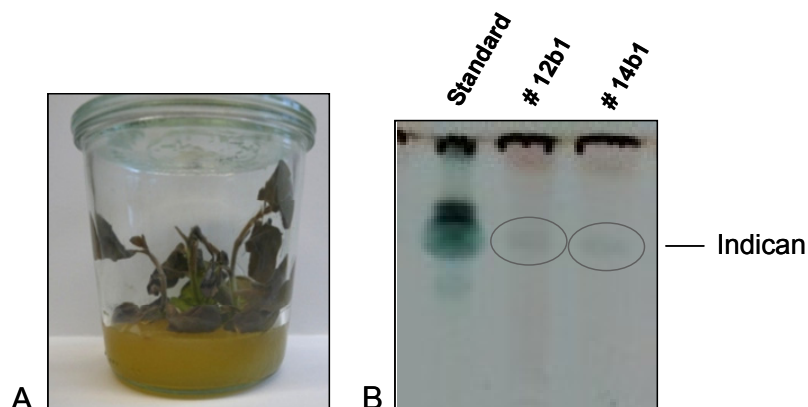


Abbildung 4.5. Untersuchungen zur Aktivität des Proteins CYP2A6. A) Phänotyp der Pflanzen 1-2 Tage nach Indolzugabe. B) Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nach Auftragung von 20 µl Blattextrakt der Linien pNT2-2A6 # 12b1 und # 14b1. Als Standard wurden 20 µl Indican in Methanol (0,7mg/ml) aufgetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des humanen CYP2A6 Proteins im Chloroplastengenom prinzipiell möglich ist. Es konnte sowohl die Bildung des Proteins als auch die Aktivität des Proteins nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse waren jedoch auf sehr junge Pflanzen beschränkt. Wurden die 3-4 Wochen alten Pflanzenlinien weiter kultiviert und zu einem späteren Zeitpunkt auf Aktivität des Transgens getestet, konnte weder RNA noch Protein nachgewiesen werden. Ebenso verhielt es sich mit Pflanzen, die nicht steril sondern auf Erde kultiviert wurden. Junge Pflanzen bildeten das Protein, wurden diese aber nach mehreren Wochen erneut getestet, konnte kein spezifisches CYP2A6-Signal mehr detektiert werden. Aus diesem Grund sollten die RNA Expressionsmuster einiger Pflanzenlinien zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

4.1.1.4 Einfluss des Pflanzenalters auf die Transkriptionsrate

Wie zuvor beschrieben, konnte das aktive Protein CYP2A6 ausschließlich in sehr jungen Pflanzen nachgewiesen werden. Wurden die Pflanzen älter, konnte zu keiner Zeit die Bildung des Proteins detektiert werden. Diese Beobachtung könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es sein, dass das Protein sehr schnell abgebaut wird, zum anderen kann aber bereits auf Transkriptionsebene ein Abbau der RNA stattfinden, sodass kein Protein mehr gebildet wird.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Samen der Pflanzenlinien pNT2-2A6 # 12b1 und pNT2-2A6 # 14-2 erneut auf Spectinomycin-haltigem Medium ausgebracht und unter Dauerlicht kultiviert. Es wurden nun Blattproben von jeder Linie zu verschiedenen Zeitpunkten genommen. Die Ernte von 200 mg Blattmaterial erfolgte 5 Wochen, 10 Wochen, 13 Wochen und 16 Wochen nach Aussaat der Samen. Die RNA wurde anschließend isoliert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der etwa 1500 Basen großen CYP2A6-mRNA erfolgte unter Verwendung einer CYP2A6 spezifischen Sonde.

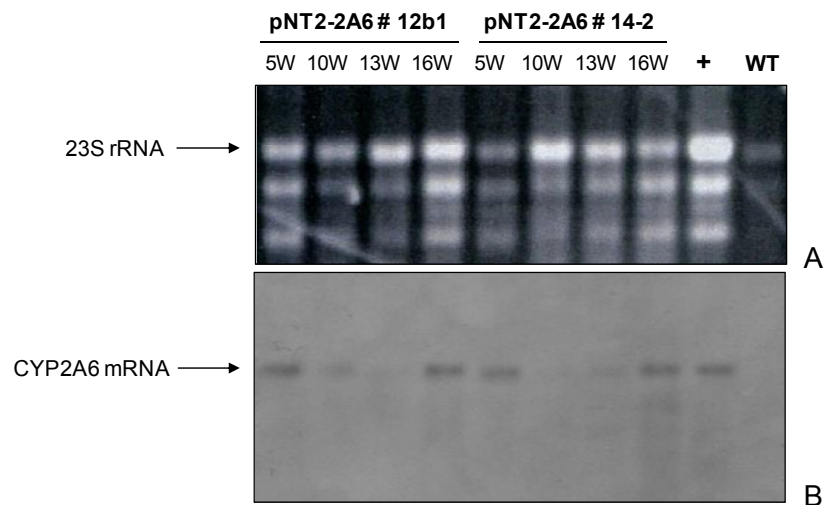


Abbildung 4.6. RNA-Blot verschieden alter Pflanzen der Linien pNT2-2A6 # 12b1 und # 14-2. Das Blattmaterial wurde nach 5, 10, 13 und 16 Wochen geerntet. A) Aufgetrennte RNA nach denaturierender Gelelektrophorese. B) Die Detektion des Transkripts erfolgte mit einer 2A6-spezifischen RNA-Sonde. +: Positiv-Kontrolle (Kerntransformante pPSI-2A6); WT: Wildtyp

Abbildung 4.6 zeigt das Ergebnis der Northern Blot Analyse. Die 5 Wochen alten Pflanzen beider Linien zeigten wie erwartet ein spezifisches RNA-Signal. Bereits 10 Wochen nach Aussaat konnte eine deutliche Abnahme der Transkriptionsrate verzeichnet werden. Nach weiteren 3 Wochen konnte keine mRNA mehr detektiert werden. Blattmaterial, das nach 16

Wochen auf Vorhandensein von CYP2A6-RNA getestet wurde, zeigte wiederum ein spezifisches RNA-Signal. Diese 16 Wochen alten Pflanzen wurden allerdings vor der Ernte auf frisches Medium gesetzt. Der Abbau der RNA hängt demnach offensichtlich auch mit der Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen zusammen. Je länger die Pflanzen sich im entsprechenden Medium befinden, umso mehr Nährstoffe werden verbraucht, sodass die RNA-Synthese nach längerer Zeit durch den relativen Mangel an Nährstoffen eingestellt wird und demzufolge kein Protein mehr gebildet werden kann. Werden die Pflanzen auf neues Medium gebracht, beginnt die Pflanze erneut mit der Synthese von RNA. Werden die Pflanzen kurze Zeit nach Aussaat auf Erde gesetzt, wird die RNA-Synthese scheinbar vollkommen eingestellt, denn es konnte zu keiner Zeit weder die CYP2A6-mRNA noch das Protein detektiert werden.

4.1.2 Charakterisierung homoplastischer pNT2-2A6-hNPR-Linien

4.1.2.1 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese

Da die Aktivität des in jungen Pflanzen gebildeten Proteins CYP2A6 sehr gering war, sollten nun Pflanzen charakterisiert werden, die zusätzlich zum 2A6-Gen das humane, für eine NADPH-Reduktase kodierende Gen *hNPR* exprimieren. Das humane Cytochrom 2A6 kann zwar eine endogene Tabakreduktase als Elektronendonator nutzen, trotzdem scheint diese Kooperation nicht effektiv genug zu sein. Zur Charakterisierung standen pNT2-2A6-hNPR-Linien bzw. deren Samen zur Verfügung, die bereits von K. Dückershoff im Rahmen ihrer Diplomarbeit auf Homoplasmie getestet waren. Diese Pflanzenlinien waren mit einem bicistronischen Expressionsplasmid transformiert, bei dem die beiden Gene *CYP2A6* und *hNPR* direkt hintereinander geschaltet und nur durch eine Ribosomenbindestelle getrennt sind. Bei Expression eines bicistronischen Plasmids in Bakterien hat das den Vorteil, dass nur eine mRNA synthetisiert wird, jedoch durch das Vorhandensein der Ribosomenbindestelle zwei Proteine gebildet werden (Parikh et al, 1997). Somit sollte hier auch die Funktionalität der Ribosomenbindestelle in den Chloroplasten evaluiert werden.

Samen der pNT2-2A6-hNPR-Linien # 1b, # 8b1, # 10d, # 11c und # 15d wurden auf Spectinomycin-haltigem MS-Medium ausgebracht und unter Dauerlicht kultiviert. Nach etwa 4 Wochen wurden 100 mg Blattmaterial entnommen und die daraus isolierte DNA auf Vorhandensein der Transgene *hNPR* und *CYP2A6* getestet. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung der intern bindenden Primer 2A6 103 und 2A6 203 für *CYP2A6* und der genspezifischen Primer hNPR 110 und hNPR 210 für *hNPR*. Es konnten bei allen getesteten

Pflanzen Banden der erwarteten Größe (hNPR ~ 1000 bp; CYP2A6 ~ 500 bp) detektiert und somit das entsprechende Transgen nachgewiesen werden.

Im Anschluss daran wurde aus je zwei verschiedenen Pflanzen jeder Linie die RNA isoliert und diese auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der CYP2A6/hNPR-mRNA erfolgte mit einer CYP2A6-spezifischen Sonde. Es konnte ein spezifisches RNA-Signal der Größe 3500 bp für Pflanzen der Linien # 1b, # 11c und # 15d nachgewiesen werden (Abbildung 4.7). Auch nach mehrmaliger Wiederholung der Northern Blot Analyse konnte die Transkription der Gene *CYP2A6* und *hNPR* für die Linien # 10d und # 8b1 nicht nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurden alle Linien der pNT2-2A6-hNPR-Pflanzen auf Vorhandensein der Proteine CYP2A6 und hNPR untersucht. Dazu wurden 200 mg Blattmaterial zerkleinert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf eine SDS-Page aufgetragen. Nach Transfer der Proteine auf eine Nylonmembran erfolgte die Detektion von CYP2A6 mit einem spezifischen 2A6-Antikörper, die Detektion von hNPR mit einem geeigneten hNPR-Antikörper. Die Bildung der Proteine konnte zu keiner Zeit nachgewiesen. Auch die RNA-Blot-Analyse von Pflanzen, die zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet wurden, brachte kein Ergebnis. Somit wurden diese Linien auch keiner Dünnschichtchromatographie unterzogen, da weder RNA noch Protein nachgewiesen werden konnte.

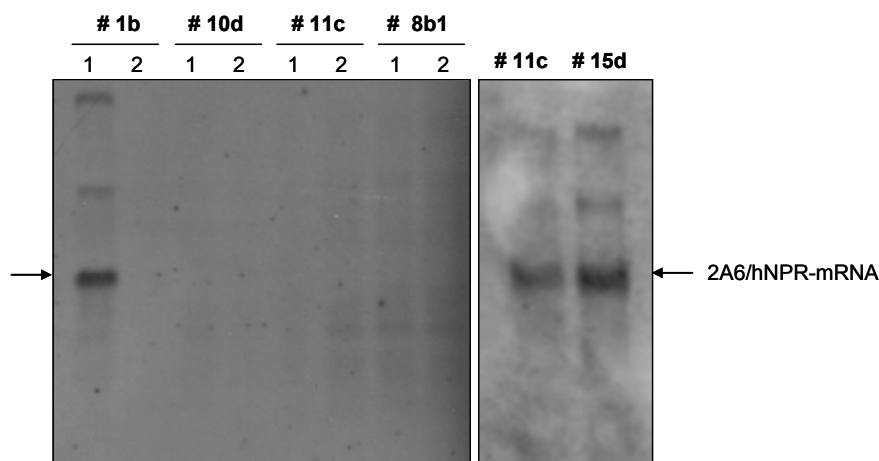


Abbildung 4.7. Ergebnis der Northern Blot Analyse homoplastischer pNT2-2A6-hNPR-Pflanzen. Ein spezifisches RNA-Signal von 3500 bp und die somit erfolgte Transkription konnte für Pflanzen der Linien # 1b, # 11c und # 15d nachgewiesen werden. Die Detektion des Transkripts erfolgte mit einer CYP2A6-Sonde.

4.1.3 Charakterisierung homoplastischer p2A6-4441-Linien

4.1.3.1 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese

Da mit den intialen Chloroplastentransformanden keine ausreichende Expression und somit Aktivität des humanen Cytochroms CYP2A6 erreicht werden konnte, sollten nun Pflanzen untersucht werden, bei denen die Integration der Expressionskassette an einer anderen Stelle erfolgte. In manchen Fällen konnte beobachtet werden, dass eine Variation in der Integrationsseite zu einer veränderten Expressionsrate führen kann (Hennig *et al.*, 2007). Der zu diesem Zweck verwendete Vektor pRB95 stellt eine modifizierte Version des pUC119-Plasmids (Zoubenko *et al.*, 1994) dar und trägt zur Selektion, wie auch der Vektor pNT2, das *aadA*-Gen, welches unter Kontrolle des plastidären Promotors *Prn* steht (Bock *et al.*, 2001). Desweiteren war das zuvor verwendete Gen CYP2A6 nochmals modifiziert, die Einführung von zwei Punktmutation an Position 240 (Leucin zu Cystein) und 297 (Asparagin zu Glutamin) innerhalb der Aminosäuresequenz (Abbildung 4.8) sollte zu einer gesteigerten Aktivität bezüglich der Indolhydroxylierung führen (Gillam *et al.*, 1999).

| | |
|---------------|---|
| CYP2A6 (pNT2) | MAASGMLLVALLVCLTV.....QQQAFQ L QGLEDFI.....MTTL N LFIG.....FLPR* |
| CYP2A6bchis | MAASGMLLVALLVCLTV.....QQQAFQ L CQGLEDFI.....MTTL Q LFIG.....FLPR HHHHH * |

Abbildung 4.8. Vergleich der Aminosäuresequenz des zuvor verwendeten CYP2A6 und des modifizierten CYP2A6bchis

Diese Pflanzenlinien wurden von M. Peer im Rahmen seiner Diplomarbeit erzeugt und auf Homoplasmie getestet. Samen der Linien p2A6-4441 # 3d, # 7e, # 10c, # 11d, #18c und # 27c wurden auf MS-Medium kultiviert. Nach etwa 5 Wochen konnte bereits erstes Blattmaterial geerntet werden. Aus 100 mg Pflanzenmaterial wurde DNA isoliert und diese unter Verwendung der genspezifischen Primer 2A6 103 und 2A6 203 auf Vorhandensein des Transgens mittels PCR getestet. Es zeigte sich, dass alle Linien das Transgen CYP2A6 enthielten. Diese standen nun für die weitere Charakterisierung zur Verfügung.

Aus je zwei verschiedenen Individuen der Linien # 7e, # 11d, # 18c und # 27c sowie aus einer Pflanze der Linien # 3d und # 10c wurde die RNA isoliert und auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen (Abbildung 4.9A). Zur Überprüfung des über Nacht erfolgten Transfers wurde die Membran am nächsten Tag mit Methylenblau angefärbt. Zur Detektion des etwa 1500 bp großen Transkripts wurde erneut die dem CYP2A6-Gen komplementäre Sonde verwendet. Für alle Linien der p2A6-4441-Pflanzen konnte eine mäßige Transkription

des *CYP2A6*-Gens in jungen Blättern nachgewiesen werden. Die Wildtypprobe zeigte wie erwartet kein Signal (Abbildung 4.9B).

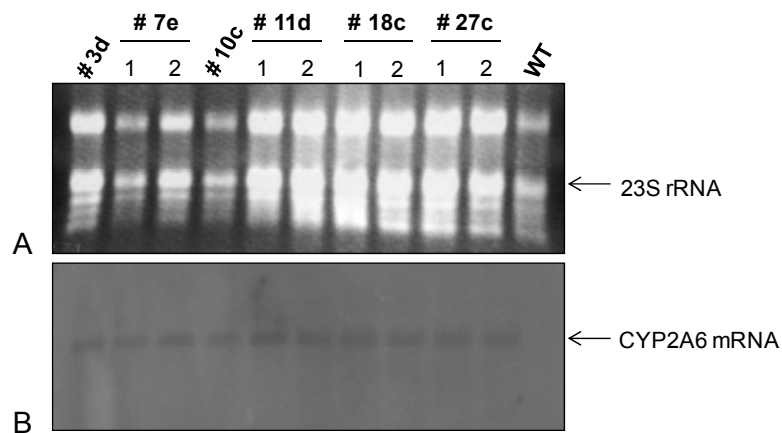


Abbildung 4.9. RNA-Blot homoplastischer p2A6-4441-Pflanzen. A) Aufgetrennte RNA nach denaturierender Gelelektrophorese B) Detektion des Transkripts nach Hybridisierung mit einer *CYP2A6*-Sonde. +: Positiv-Kontrolle; WT: Wildtyp

Da die Bildung des Transkripts erfolgreich nachgewiesen wurde, konnte nun mittels Immunoblot die Synthese des Proteins *CYP2A6* überprüft werden. Etwa 200 mg Blattmaterial jeder Linie wurden bei 95°C für 10 min erhitzt, der Überstand nach Zentrifugation auf eine SDS-Page aufgetragen und die Proteine anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion des Proteins *CYP2A6* erfolgte mit einem monoklonalen *CYP2A6*-Antikörper. Es konnte für alle Linien, mit Ausnahme der Linie # 3d, die Synthese des Proteins nachgewiesen werden, die Signale des Immunoblots korrelierten mit der relativen Molekülmasse von etwa 52000 für das Protein. Für Blattmaterial des Wildtyps (WT) konnte wie erwartet kein Signal detektiert werden (Abbildung 4.10).

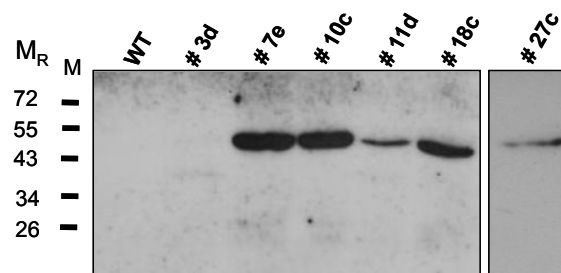


Abbildung 4.10. Immunoblot der p2A6-4441-Pflanzenlinien. Aufgetragen wurden 20 µl Blattextrakt der verschiedenen Linien. Die Detektion des Proteins *CYP2A6* erfolgte unter Verwendung eines spezifischen 2A6-Antikörpers. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M). WT: Wildtyp

4.1.3.2 Aktivitätsnachweis von CYP2A6 nach Indol-Zugabe

Da die Bildung des Proteins CYP2A6 erfolgreich in fast allen Linien der p2A6-4441-Pflanzen nachgewiesen werden konnte, sollte nun auch hier die Funktionalität beziehungsweise die Aktivität des Proteins untersucht werden. Dies erfolgte analog zu vorangegangenen Versuchen mit pNT2-2A6-Pflanzenlinien. Dazu wurden Samen der Linien p2A6-4441 # 3d und # 7e auf Spectinomycin-haltiges Medium ausgebracht und unter Dauerlicht kultiviert. Obwohl für Linie # 3d kein Protein detektiert werden konnte, wurde diese für eine Dünnschichtchromatographie verwendet, da für den Aktivitätsnachweis Blattmaterial von etwa 3 Wochen alten Pflanzen geerntet wurde. Der oben beschriebene Proteinnachweis erfolgte nach 5 Wochen, sodass diese Linie anfangs möglicherweise trotzdem Protein bildete. 2-3 Körnchen des Feststoffes Indol wurden in die Kultivierungsgefäße gegeben. Auch hier konnte bereits nach einigen Stunden eine rötliche Verfärbung des Mediums beobachtet werden. Am folgenden Tag mussten die Pflanzen geerntet werden, da diese bereits wieder anfangen zu welken. Je 200 mg des Blattmaterials wurden nun mit Aceton extrahiert, der Rückstand in 20 µl Methanol aufgenommen und auf eine Kieselgelplatte punktförmig aufgetragen. Nach erfolgtem Lauf wurde die Platte mit Salzsäure besprüht und für eine halbe Stunde getrocknet. In Abbildung 4.11 ist das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie zu sehen. Für beide getestete Linien konnte die Bildung von Indican nachgewiesen werden. Das heißt, dass das in den Pflanzen exprimierte CYP2A6 in aktiver Form vorliegt und in der Lage ist, mithilfe einer endogenen NADPH-Reduktase Indol zu Indoxyl zu hydroxylieren und als Indican zu speichern. Die Bildung indigoider Pigmente konnte somit zwar nachgewiesen werden, war aber erneut eher gering. Das lässt wiederum auf eine unzureichende Bildung des Proteins, einen sehr schnellen Abbau des Proteins, oder auf eine geringe Interaktion mit der NADPH-Reduktase schließen.

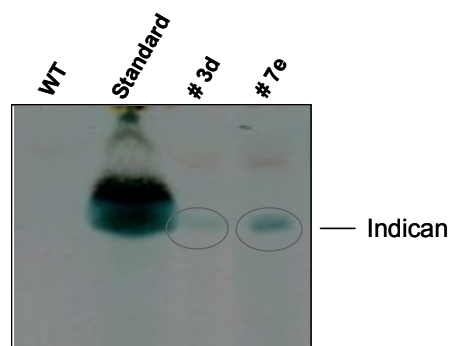


Abbildung 4.11. Ergebnis der Dünnschichtchromatographie nach Extraktion von 200 mg Blattmaterial. Die Aktivität des Proteins konnte für die Linien # 3d und # 7e nachgewiesen werden. Als Standard wurden 20 µl Indican (0,7mg/ml) aufgetragen.

Die Expression des humanen CYP2A6 unter Verwendung eines alternativen Expressionsvektors konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Doch auch in diesem Fall beschränkte sich die Synthese des aktiven Proteins auf sehr junge, 3-4 Wochen alte Pflanzen. Wurden ältere Pflanzen mittels Immunoblot auf das Vorhandensein des Proteins getestet, konnte zu keiner Zeit ein 2A6-spezifisches Signal detektiert werden.

4.1.3.3 Einfluss des Pflanzenalters auf die Transkriptionsrate

Wie zuvor beschrieben, konnte die Expression des humanen CYP2A6 ausschließlich in sehr jungen Pflanzen nachgewiesen werden. Die Vermutung lag nahe, dass auch hier ein Abbau der RNA beziehungsweise das Einstellen der RNA-Synthese Gründe für die fehlende Proteinsynthese sind. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Samen der Linien p2A6-4441 # 10c und # 27c auf frisches MS-Medium ausgebracht und kultiviert. Die Ernte von etwa 100 mg Pflanzenmaterial erfolgte 5, 9, 11 und 14 Wochen nach Aussaat. Anschließend wurde die RNA isoliert, auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und über Nacht auf eine Membran transferiert. Die Detektion der 1500 bp großen CYP2A6-RNA erfolgte unter Verwendung einer dem *CYP2A6*-Gen komplementären Sonde. Wie erwartet konnten spezifische Signale für beide Linien, die 5 Wochen alt waren, detektiert werden. Bereits nach 9 Wochen konnte eine deutliche Abnahme der Transkription beziehungsweise das Fehlen der spezifischen Transkripte beobachtet werden. Wie zuvor für pNT2-2A6-Pflanzen gezeigt, begann auch hier die Wiederaufnahme der Transkription des *CYP2A6*-Gens erst nach Umsetzen der Pflanzen auf frisches Nährmedium (Abbildung 4.12). Ebenso scheint die RNA- und die Proteinsynthese vollkommen eingestellt zu werden, sobald etwas ältere Pflanzen auf Erde gebracht werden.

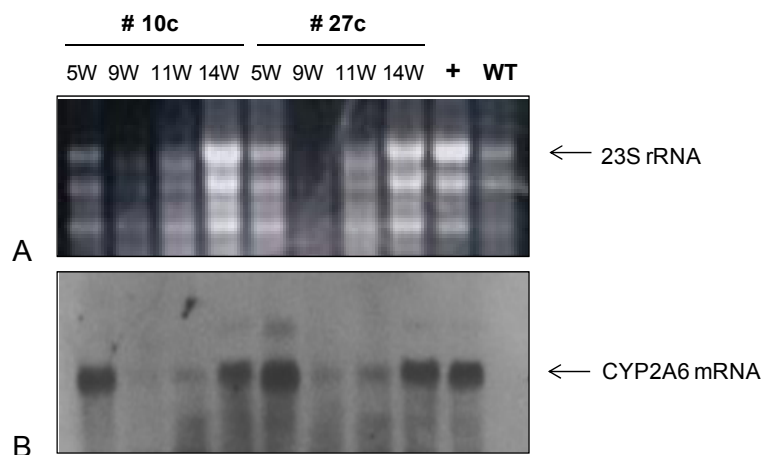


Abbildung 4.12. RNA-Blot verschieden alter Pflanzen der Linien p2A6-4441 # 10c und # 27c. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte 5, 9, 11 und 14 Wochen nach Aussaat. Nach 14 Wochen wurden die Pflanzen auf neues Medium überführt. A) Aufgetrennte RNA nach denaturierender Gelelektrophorese. B) Detektion der RNA (Signal der Größe 1500 bp) mit einer CYP2A6-spezifischen Sonde. +: Positiv-Kontrolle (Kerntransformante pPSI-2A6); WT: Wildtyp

4.2 Optimierung des Expressionssystems

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des humanen CYP2A6 durch Verwendung der Vektoren pNT2 und pRB95 in den Chloroplasten möglich war. Da die Bildung des Proteins aber nur in den Kotyledonen, das heißt in einem sehr frühen Zustand nachweisbar war und auch die Aktivität des Proteins sehr gering war, sollte nun die Gensequenz, als auch das Expressionssystem weiter optimiert werden.

Dazu wurde eine modifizierte CYP2A6-Sequenz (2A6opt) generiert und von der Firma Mr. Gene synthetisiert und bezogen. Diese wurde zuvor einer Kodonoptimierung unterzogen und enthielt im Vergleich zu den bisher verwendeten Sequenzen zusätzlich drei Aminosäuren am N-Terminus (Abbildung 4.13). Die Kodonoptimierung sollte zu einer verbesserten Proteinexpression führen und eventuell die RNA-Stabilität erhöhen. Desweiteren sollte ein alternativer Expressionsvektor verwendet werden, der den konstitutiven Promotor *prn* enthielt.

| | | | | | | |
|---|-------|--------------|-----------|--------------|----------------|-------------------|
| | | Section 1 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (1) | 1 | 10 | 20 | 30 | 41 |
| | (1) | ----- | ATGGCT | GCTTCAGGA | ATGTTATTAGTGGC | CTT |
| | (1) | ATGGCTCAT | ATGGCC | GCTTC | TGGT | ATGTTATTAGTGGCTTT |
| | | Section 2 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (42) | 42 | 50 | 60 | 70 | 82 |
| | (33) | GCTGGTCTG | CTTGACTGT | GATGGTCT | TGATGTCT | GTTTGGC |
| | (42) | ACTGGTT | TGCT | TGACTGT | CATGGTAC | TGATGTCTCGTGTGGC |
| | | Section 3 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (83) | 83 | 90 | 100 | 110 | 123 |
| | (74) | AGCAGAGGAA | GAGCAAGGG | GAACT | GCCTCCGGG | ACCCACC |
| | (83) | AGCAAAGGAA | ATC | CAAGGG | AAACT | TCCACCTGGTCCCTACA |
| | | Section 4 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (124) | 124 | 130 | 140 | 150 | 164 |
| | (115) | CCATTGCC | CTT | CATTGGAACTAC | CTGCAGCTG | AACACAGA |
| | (124) | CCATTGCC | TTT | ATTGGAACTAC | TGCAGCTT | AACACAGA |
| | | Section 5 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (165) | 165 | 170 | 180 | 190 | 205 |
| | (156) | GCA | GATGTA | CAACTC | CCT | CATGAA |
| | (165) | GCA | AATGTA | TAACTC | ATT | AATGAA |
| | | Section 6 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (206) | 206 | 220 | 230 | 246 | |
| | (197) | GCCCCGTGTT | CACCAT | TCA | TTGGGG | CCCCGGCGG |
| | (206) | GTCCCCGTGTT | TACCAT | ACAT | TTGGGC | CCAGACGA |
| | | Section 7 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (247) | 247 | 260 | 270 | 287 | |
| | (238) | GTGCTGTGTGG | ACAT | GATGCCGT | CAGG | GAGGCTCT |
| | (247) | GTCTCTGTGTGG | TAC | GATGCCGT | GAG | A |
| | | Section 8 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (288) | 288 | 300 | 310 | 328 | |
| | (279) | C | CAGGC | TGAGGAGTT | CAGC | GGG |
| | (288) | T | CAGGC | A | GAGGAGTT | TTCT |
| | | Section 9 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (329) | 329 | 340 | 350 | 369 | |
| | (320) | T | C | GACTGGGT | CTT | CAAGG |
| | (329) | T | T | GACTGGGT | TTT | TAAAGG |

| | | | | | | |
|---|-------|----------------|------------------|----------------|-------------------|-----------|
| | | Section 10 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (370) | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 |
| | (361) | GGGGAGCG | CGCCAAGCA | GCTCCGGCG | CTTCTCCATCGCCAC | |
| | (370) | GGGGAGCGA | GCCAAACA | ACTTCGTAG | ATTTCTATCGCAAC | |
| | | Section 11 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (411) | 411 | 420 | 430 | 440 | 451 |
| | (402) | CCTGCGG | GACTTCGGGGT | GCGCAAGCG | AGGCATCGAGGAGC | |
| | (411) | TTTACGTGA | TTCGGGGT | TGGTAAACG | TGGTATTGAGAGAAA | |
| | | Section 12 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (452) | 452 | 460 | 470 | 480 | 492 |
| | (443) | GCAATCCA | GAGGAGGCG | GGCTTCCTCAT | CAGCGCCCTCCGG | |
| | (452) | GAAATCCA | AGAGGAAGC | TGGTTTCTTAT | TGACGCACTTCGT | |
| | | Section 13 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (493) | 493 | 500 | 510 | 520 | 533 |
| | (484) | GGCAC | TGGCGGCGCA | ATATCGATCCCAC | CTTCTTCCTGAG | |
| | (493) | GGCAC | AGGTGGAGCTAA | CATCGATCCCAC | ATTCTTCCTGATC | |
| | | Section 14 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (534) | 534 | 540 | 550 | 560 | 574 |
| | (525) | CCGCACAGTC | TCCAAATGT | CATCAGCTCC | CATTGTCTTTGGGG | |
| | (534) | ACGAAC | TGTAGTAACGT | TATCTCTCT | TATAGTGTTTGGCG | |
| | | Section 15 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (575) | 575 | 580 | 590 | 600 | 615 |
| | (566) | ACCGCTTTTGA | CTATAAGGA | CAAGAGTTCTGT | TCATGTGTG | |
| | (575) | ATCGT | TTTGA | TACAAAGAT | AAAGATTCTT | TCATTACTG |
| | | Section 16 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (616) | 616 | 630 | 640 | 656 | |
| | (607) | CGCATGATG | CTAGGAATCT | TTCCAGTTCACGTC | AACCTCCAC | |
| | (616) | AGAATGATG | TAGGAATTTT | TCAGTTCACATC | TACCTCTAC | |
| | | Section 17 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (657) | 657 | 670 | 680 | 697 | |
| | (648) | GGG | CAGCTCTAT | GAGATGTTCTCT | TCGGTGATGAAACACC | |
| | (657) | TGGC | CACTGTAC | GAAATGTTTAGC | TCGTGTGATGAAACATT | |
| | | Section 18 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (698) | 698 | 710 | 720 | 738 | |
| | (689) | TGCCAGGACCACAG | CAACAGGCCTT | TCAGTTGCTG | CAAGGG | |
| | (698) | TGCCAGGACCACA | CAACAGGCCTT | CAACTTTGC | CAAGGG | |
| | | Section 19 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (739) | 739 | 750 | 760 | 779 | |
| | (730) | CTGGAGGA | CTTCATAGC | CAAGAAGGT | GAGGCACAAACAGCG | |
| | (739) | CTGGAGGA | TTTATATGC | TAAAGGT | TGAACATAATCAGAG | |
| | | Section 20 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (780) | 780 | 790 | 800 | 810 | 820 |
| | (771) | CACGCT | TGATCCCAATTCC | CCACGGG | GACTTCATTGACTCCT | |
| | (780) | AAC | TTTAGACCCAAATTCC | CCCGTGAT | TTTCATCGATAGTT | |
| | | Section 21 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (821) | 821 | 830 | 840 | 850 | 861 |
| | (812) | TTCTCAT | CCGCATGCAGGA | GGAGGAGAAGAAC | CCCAACACG | |
| | (821) | TCTTGAT | TAGAAATGCAGGA | AGAGAGAAGAA | TCCCAACACA | |
| | | Section 22 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (862) | 862 | 870 | 880 | 890 | 902 |
| | (853) | GAGTTC | TACTTGAAAAAC | CTGGTGATGAC | CACGTTGAACTT | |
| | (862) | GAGTTT | TACCTTAAAAAC | TGGTTCATGACA | AACTTTGCAATT | |
| | | Section 23 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (903) | 903 | 910 | 920 | 930 | 943 |
| | (894) | CTTCAT | TGGGGGCAC | CGAGACCGTC | CAGCACCACTGCGCT | |
| | (903) | GTTTCAT | CGAGGTAC | AGAAACAGT | TTCTACCACA | CTTCGTT |
| | | Section 24 | | | | |
| 2A6-coding sequence from bc his seq 2A6opt | (944) | 944 | 950 | 960 | 970 | 984 |
| | (935) | ATGGC | TTCTTGCTGC | TTCATGAAGCACCC | AGAGGTGGAGGCC | |
| | (944) | ATGGA | TTCTTACTGT | TGATGAAGCACCC | GAAGTGGAGGCA | |

| | | | | | | |
|---------------------------------|--------|-----------------|----------------|--------------|-------------|---------|
| | | Section 25 | | | | |
| | (985) | 985 | 990 | 1000 | 1010 | 1025 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (976) | AAAGTCCA | TGAGGAGAT | TGACAGAGT | GATCGGCAAG | AAACCG |
| seq 2A6opt | (985) | AAAGTCCA | CAGGAGAT | CATAGGCT | TATAGGTAA | AAATAG |
| | | Section 26 | | | | |
| | (1026) | 1026 | 1040 | 1050 | | 1066 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1017) | GCAGCC | CAAGTTTGA | GGACCGGGC | CAAGATGCC | TACATGG |
| seq 2A6opt | (1026) | GCAGCC | TAAAGTTTGA | AGACAGAGC | TAAATGCC | TATATGG |
| | | Section 27 | | | | |
| | (1067) | 1067 | 1080 | 1090 | | 1107 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1058) | AGGCAGTGAT | CACGAGAT | CCAAAGATT | TGGAGACGT | GATC |
| seq 2A6opt | (1067) | AGGCAGTGAT | TACGAAAT | CAAAGATT | CGGACGCT | TAT |
| | | Section 28 | | | | |
| | (1108) | 1108 | 1120 | 1130 | | 1148 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1099) | CCCATGAGT | TTGGCCCGCAG | AGTCAAAAAGG | ACACCAAGTT | |
| seq 2A6opt | (1108) | CCCATGAGC | TTGGCAAGAC | GTGTTAAAAAGG | ACACCAAGTT | |
| | | Section 29 | | | | |
| | (1149) | 1149 | 1160 | 1170 | | 1189 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1140) | TGGGATTTCTTCCT | CCCTAAGGGC | CACCGAAGT | GTACCCTA | |
| seq 2A6opt | (1149) | CCGTGATTTCTTCCT | GCCTAAGGGT | TACTGAGGT | CATCCAA | |
| | | Section 30 | | | | |
| | (1190) | 1190 | 1200 | 1210 | 1220 | 1230 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1181) | TGCTGGGCTCTGTG | CTGAGAGAC | CCAGTTTCTT | CTCCAAC | |
| seq 2A6opt | (1190) | TGTGGGCTCTGTG | TGCGAGAT | CCTAGTTTCTT | TTC AAC | |
| | | Section 31 | | | | |
| | (1231) | 1231 | 1240 | 1250 | 1260 | 1271 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1222) | CCCAGGACTTCAA | TCCCAAGCACTTC | TGAATGAGAA | GGG | |
| seq 2A6opt | (1231) | CCTCAAGATTTCAA | CCCTCAACATTC | TGAATGAAA | AGG | |
| | | Section 32 | | | | |
| | (1272) | 1272 | 1280 | 1290 | 1300 | 1312 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1263) | GCAAGTTT | AAGAAGAGTGATGC | TTTTGTG | CCCTTTC | CATCG |
| seq 2A6opt | (1272) | ACAATT | AAGAAGAGTGATGC | TTTTGT | CCCTTC | TCTATG |
| | | Section 33 | | | | |
| | (1313) | 1313 | 1320 | 1330 | 1340 | 1353 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1304) | GAAAGCGGAAC | TGTTTGGAGAAGG | CCGCGG | AGATGGAG | |
| seq 2A6opt | (1313) | GTAAGCGAAAT | TGTTTGGAGAAGG | ATGCGCG | TATGGAG | |
| | | Section 34 | | | | |
| | (1354) | 1354 | 1360 | 1370 | 1380 | 1394 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1345) | CTCTTCTCTTCTT | CACCACCGT | CATGCAGAA | TTCCGCT | |
| seq 2A6opt | (1354) | TATCTCTCTCTT | TACCAC | TGTATGC | AAATTT | CGTCT |
| | | Section 35 | | | | |
| | (1395) | 1395 | 1400 | 1410 | 1420 | 1435 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1386) | CAAGTCCTCC | AGTCACTAAGG | CATTGACGT | GTCC | CCCA |
| seq 2A6opt | (1395) | CAAGTCATC | ACAAGCCAAAGG | ATATAGACGT | TAGT | CCCA |
| | | Section 36 | | | | |
| | (1436) | 1436 | 1450 | 1460 | | 1476 |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1427) | AACACGTGGG | CTTGCCACGAT | CCACGAA | ACTAC | ACCATG |
| seq 2A6opt | (1436) | AGCATGTC | GGTTTGCCAC | TATCTCTA | GAAACTA | TACCATG |
| | | Section 37 | | | | |
| | (1477) | 1477 | 1490 | 1500 | 1510 | |
| 2A6-coding sequence from bc his | (1468) | AGCTTC | TGCCCGGCC | ACC-ATC | ACCATCACTAA | |
| seq 2A6opt | (1477) | TCA | TCTTGCC | TAGGTAGT | ATCTAG | ----- |

Abbildung 4.13. Sequenzvergleich (sequence alignment) der zuvor verwendeten Sequenz *CYP2A6bchis* und der optimierten Sequenz *CYP2A6opt*. Das synthetische Gen besitzt etwa noch 75% Sequenzidentität im Vergleich zur nativen 2A6 Sequenz.

4.2.1 Klonierung des optimierten Gens *2A6opt*

Das von der Firma Mr. Gene bezogene Plasmid wurde in kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden unter Verwendung der Primer 2A6opt 101 und 2A6opt 201 auf Vorhandensein des Gens getestet. Primer 2A6opt 101 bindet innerhalb des Gens bei ca. 800 bp, Primer 2A6opt 201 bindet bei ca. 1300 bp, sodass positive Klone ein Fragment von etwa 500 bp nach Gelelektrophorese aufweisen sollten. Positiv getestete Klone und die daraus isolierten Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XbaI* verdaut, um danach in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Subklonierungsvektor ligiert zu werden. Die Gelelektrophorese zeigte, dass das Gen *2A6* nicht aus dem erhaltenen Plasmid geschnitten werden konnte, was auf das Fehlen von mindestens einer Schnittstelle zurückzuführen war. Nach Überprüfung der synthetisierten Sequenz konnte festgestellt werden, dass unmittelbar vor der eingebrachten Schnittstelle *XbaI* die Basen Guanin und Adenin zu einer Sequenzabfolge führen, die in prokaryotischen Organismen, in diesem Fall in den TOP10 Zellen, zu einer Methylierung der Restriktionsschnittstelle führt und das Enzym an dieser Position nicht schneiden kann (Sequenz GATC). Da eine Klonierung in JM110 Zellen, welche keine *dam*-Methylase exprimieren, nicht erfolgreich war, wurden zwei neue Primer anhand der optimierten CYP2A6-Sequenz entwickelt. Der forward-Primer 2A6opt 103 fügt lediglich eine *NdeI*-Schnittstelle an den 5'-Abschnitt des Gens. Der reverse-Primer 2A6opt 202 wurde so gewählt, dass die Basenabfolge vor der Restriktionsschnittstelle *XbaI* verändert wird, aber kein Aminosäureaustausch stattfindet. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung der *Pfu*-Polymerase und des Plasmids pMA-2A6opt als Template. Das amplifizierte Fragment der Größe 1500 bp wurde nach Elektrophorese aus dem Gel eluiert, in den Klonierungsvektor pCRblunt ligiert und in TOP10 Zellen transformiert. Das Plasmid wurde aus positiv getesteten Klonen isoliert, einem Kontrollverdau mit *NdeI* und *XbaI* unterzogen und sequenziert. Da es zu keiner Punktmutation oder Leserahmenverschiebung durch die Amplifikation kam, konnte dieses Plasmid für nachfolgende Klonierungen verwendet werden. Da das optimierte Gen in Tabakchloroplasten exprimiert werden sollte, musste dieses zunächst in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Zur Verfügung stand der Vektor pKP9, ein modifizierter Vektor, der zur erfolgreichen Integration ins Chloroplastengenom die plastidären Gene *psaB-rps14-trnFM* und *trnG-psbZ* trägt. Desweiteren stand ein Subklonierungsvektor zur Verfügung (pHK20). In diesen wird das Transgen zunächst zwischen das Promotor-Gen *prn* und das Terminator-Gen *trbcL* kloniert. Diese Expressionskassette kann dann in den Vektor pKP9 überführt werden. Das Gen *2A6opt* wurde zunächst unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NdeI* und *XbaI* aus dem Klonierungsvektor geschnitten. Der Subklonierungsvektor pHK20 wurde ebenfalls mit den

gleichen Enzymen verdaut und das zwischen diesen Schnittstellen gelegene *nptII*-Gen wurde entfernt. Die entstandenen Fragmente wurden ligiert und in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Positiv getestete Bakterienklone wurden kultiviert und das entstandene Plasmid p2A6opt-2801 isoliert. Ein anschließender Kontrollverdau mit den Enzymen *NdeI* und *XbaI* resultierte in einem Fragment der Größe 1500 bp, welches der Größe des Gens *2A6opt* entsprach, und in einem Fragment der Größe 3200 bp, welches der Größe des restlichen Vektor entsprach.

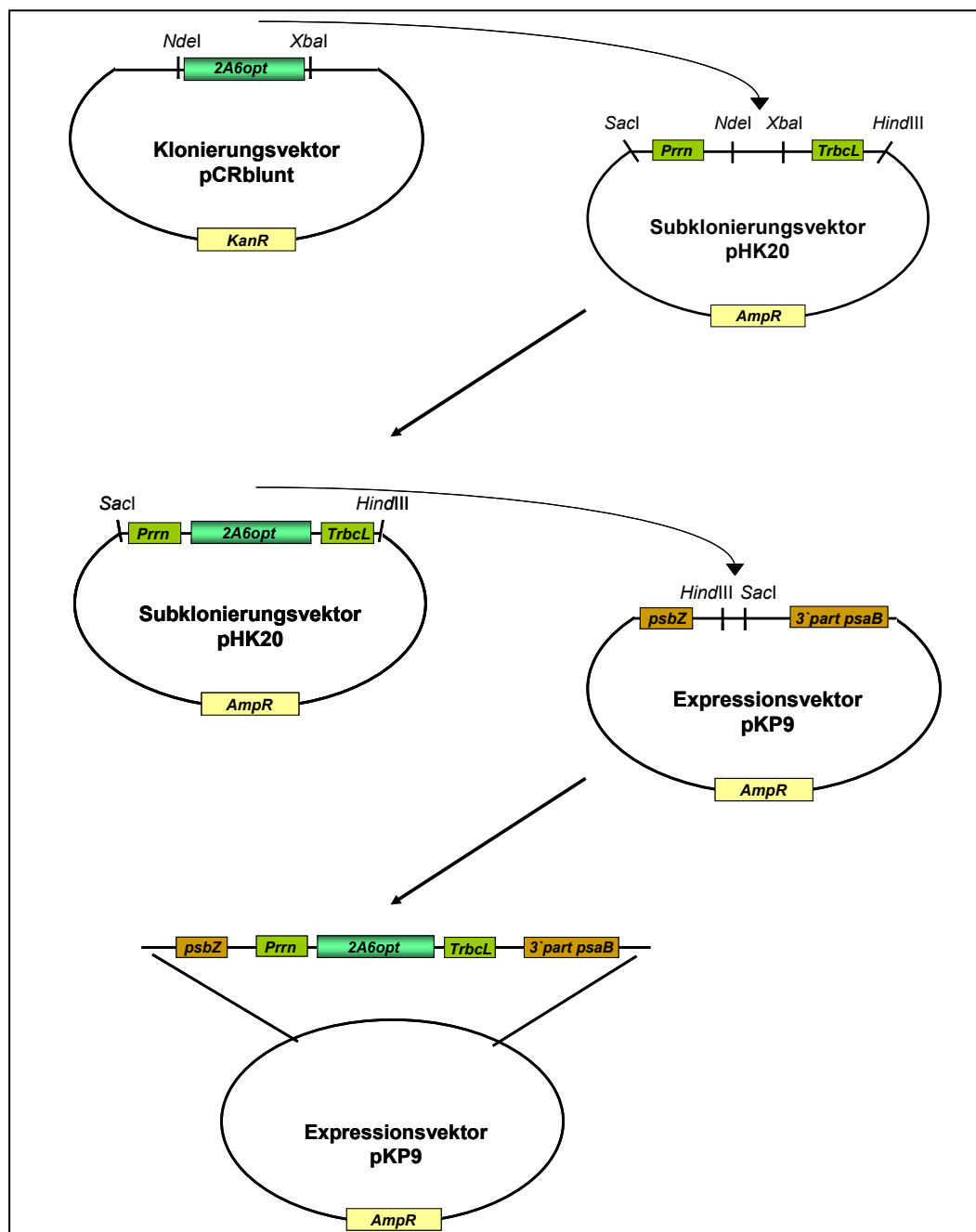


Abbildung 4.14. Schema zur Klonierung des optimierten Gens 2A6opt. Die Klonierung des Gens *2A6opt* erfolgte zunächst in den Subklonierungsvektor pHK20. Durch Restriktion mit *SacI* und *HindIII* konnte nun die Expressionskassette in den Chloroplastenexpressions-vektor pKP9 ligiert werden.

Jetzt konnte eine weitere Restriktion durchgeführt werden, um das eingebrachte Gen inklusive der Expressionskassette aus dem Vektor zu schneiden. Die Expressionskassette setzte sich in dem Fall aus dem *prn*-Promotor, einer Ribosomenbindestelle, dem Gen *2A6opt* sowie einem Terminator zusammen und wurde mittels der Enzyme *SacI* und *HindIII* aus dem Subklonierungsvektor geschnitten. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das entsprechende Fragment der Größe 1800 bp aus dem Gel eluiert, in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Expressionsvektor pKP9 ligiert und transformiert (Abbildung 4.14). Das Plasmid p2A6opt-4701 wurde aus positiven Bakterienklonen isoliert und ein entsprechender Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *HindIII* zeigte den korrekten Einbau der Expressionskassette. Dieser erzeugte Expressionsvektor stand nun für die Transformation von Tabakpflanzen zur Verfügung.

4.2.2 Stabile Chloroplastentransformation

Die Transformation von *N. tabacum* Chloroplasten erfolgte wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Es wurden 10 Tabakblätter transformiert. Diese wurden im Anschluss in kleinere Blattstücke geschnitten, zunächst zwei Tage auf RMOP-Medium kultiviert und anschließend zur Selektion transgener Zellen auf RMOP-Medium mit Spectinomycin transferiert. Die entstandenen drei Kalluskulturen wurden vom übrigen Gewebe abgetrennt und auf Spectinomycin-haltigem Medium bis zur Ausbildung einer Pflanze kultiviert. Zur Identifizierung transgener Kalli bzw. transgener Pflanzen wurden etwa 100 mg Gewebematerial entnommen und zerkleinert. Die DNA-Isolierung erfolgte nach einer Methode von Rogers & Bendich (1995). Die DNA wurde anschließend mittels PCR und unter Verwendung der intern bindenden, genspezifischen Primer 2A6opt 101 und 2A6opt 201 auf das Vorhandensein des Transgens *CYP2A6opt* überprüft. Nach Gelelektrophorese konnte bei allen drei getesteten DNA-Proben ein Fragment der Größe 500 bp unter UV-Licht detektiert werden, somit standen die drei erzeugten transgenen Pflanzen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

4.2.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen

Die ersten Pflanzen, die nach der Chloroplastentransformation generiert werden, befinden sich in einem heteroplastischen Zustand. Die Integration der Fremd-DNA durch Beschuss der Blätter erfolgt nur bei einem geringen Teil der Chloroplastengenome. Somit enthält jede transgene Linie eine Mischpopulation von Wildtyp-Genomen und transformierten Genomen.

Durch hohen Selektionsdruck müssen die Wildtyp-Genome verdrängt werden. Dazu werden Blattstücke der generierten Pflanzen entnommen und erneut auf Selektionsmedium kultiviert, um eine neue Generation zu erzeugen. Nach 2-4 Regenerationszyklen werden alle Wildtyp-Genome verdrängt, sodass homoplastische Pflanzenlinien entstehen.

Mithilfe der Methode des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) können homoplastische Pflanzen von heteroplastischen Pflanzen unterschieden werden. Dabei wird die DNA der Pflanzenlinien mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten, wobei je nach Wahl des Enzyms unterschiedlich große Fragmente durch Restriktion der Wildtyp-DNA und der transgenen DNA entstehen. Aus 100 mg Blattmaterial der transgenen Linien p2A6opt-4701 # 1c, # 2c und # 3c wurde erneut DNA isoliert. Je 2 µg der genomischen DNA wurden mit *Bam*HI über Nacht verdaut, sodass eine Vielzahl von unterschiedlich langen Fragmenten entstand. Das gewählte Enzym sollte innerhalb des *psaB*-Gens und des *psbC*-Gens der plastidären DNA schneiden, sodass bei Restriktion von Wildtyp-DNA ein Fragment der Größe 4400 bp entsteht (Abbildung 4.15A). Wurde das Transgen 2A6opt erfolgreich in das Plastidengenom integriert und wurden alle Wildtyp-Genome verdrängt, entsteht ein größeres Fragment der Größe 7900 bp (Abbildung 4.15B).

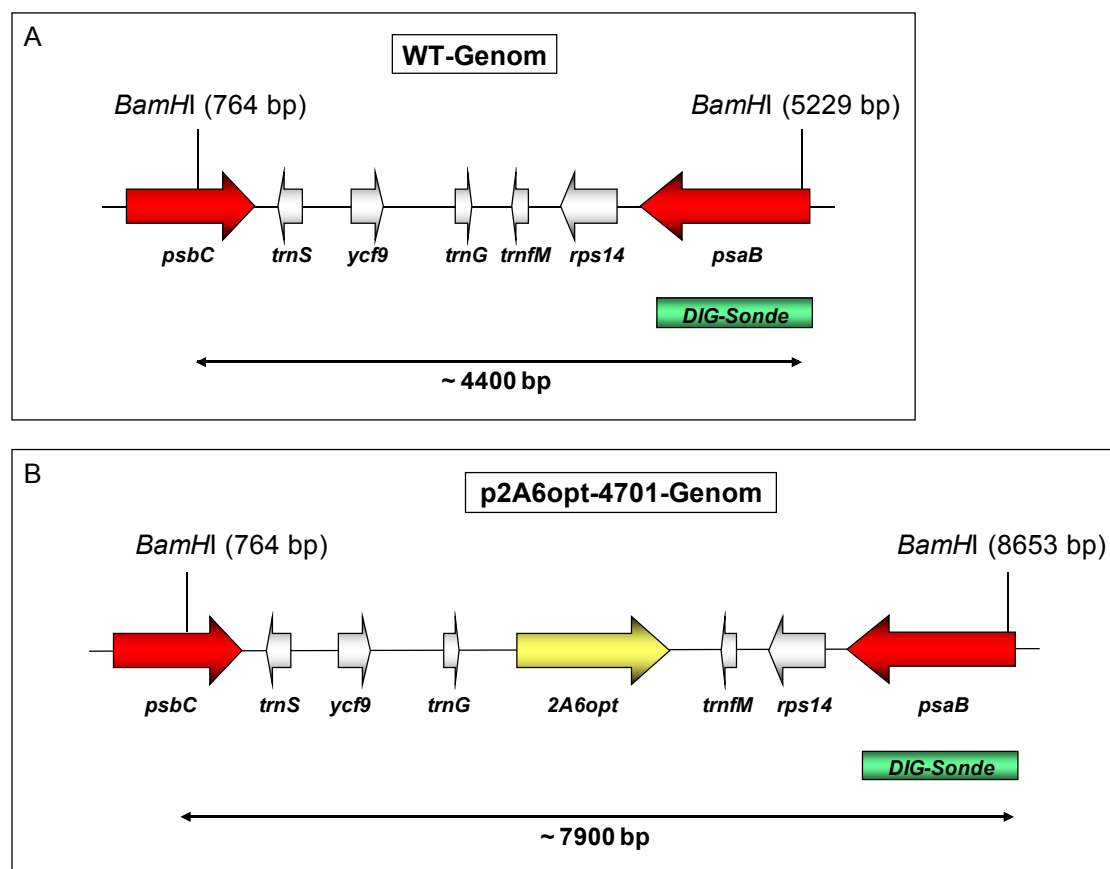


Abbildung 4.15. Schematische Darstellung der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP). A) Restriktion und Detektion des Wildtyp-Genoms. B) Restriktion und Detektion eines transformierten Plastiden-Genoms. Erklärungen im Text.

Werden beide Fragmente detektiert, befinden sich die Pflanzen noch in einem heteroplastischen Zustand. Da innerhalb dieser Fragmente das plastidäre Gen *psaB* liegt, können diese mithilfe einer dem *psaB*-Gen komplementären Sonde auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Die mit *Bam*HI über Nacht verdaute DNA der Proben wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit der *psaB*-komplementären Sonde hybridisiert. Allerdings war es nicht möglich, die DNA-Fragmente zu detektieren. Auch die mehrmalige Wiederholung des Versuchs brachte kein Ergebnis.

4.2.4 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese

Um genügend Blattmaterial für den RNA- und Proteinnachweis zur Verfügung zu haben, wurden die drei transgenen Linien der p2A6opt-4701-Pflanzen in größere Gefäße gesetzt und für etwa 2-3 Wochen kultiviert. Desweiteren wurde eine neue DIG-dUTP-markierte Sonde, die zu dem optimierten Gen 2A6opt komplementär ist, benötigt. Als Template für den PCR-Ansatz diente das Plasmid p2A6opt-1400. Die Amplifikation eines 700 bp großen Fragments erfolgte unter Verwendung der Primer 2A6opt 101 und 2A6opt 201 sowie der DIG-markierten dNTPs. Nach Überprüfung der Amplifikation mittels Gelelektrophorese zeigte sich, dass die Markierung des 2A6opt-Fragments mit Digoxigenin erfolgreich war. Das PCR-Produkt konnte als Sonde verwendet werden. Aus den transgenen Pflanzen p2A6opt-4701 #1c, # 2c und # 3c wurde die RNA isoliert, über ein denaturierendes Agarosegel aufgetrennt, um eine eventuelle Denaturierung der RNA auszuschließen (Abbildung 4.16A), und über Nacht auf eine Membran transferiert. Die Membran wurde zur Überprüfung des Transfers reversibel mit Methylenblau angefärbt (Abbildung 4.16B) und anschließend mit der dem 2A6opt-Gen komplementären Sonde hybridisiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Detektion der Transkripte mit einem DIG-markierten Antikörper. Trotz der intakten RNA der transgenen Pflanzen konnte kein spezifisches Signal auf dem Röntgenfilm detektiert werden. Sowohl die erneute Überprüfung der Sonde als auch die Wiederholung der Northern-Blot-Analyse führt zu keinen Ergebnissen.

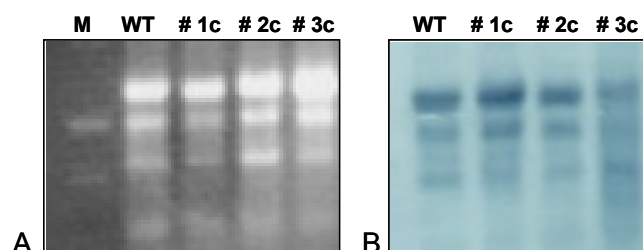


Abbildung 4.16. A) Aufgetrennte RNA nach Elektrophorese. B) Methylblaufärbung isolierter Gesamt-RNA. M: 1 kb DNA-Marker

Dennoch wurde überprüft, ob diese Pflanzen in der Lage sind, das Protein CYP2A6 zu bilden. Dazu wurden 100 mg Blattmaterial mit 300 µl 2 x SDS-Probenpuffer erhitzt und die Proteine über ein SDS-Gel getrennt. Nach Transfer der Gesamt-Proteine erfolgte die Detektion des CYP2A6-Proteins mit einem monoklonalen, CYP2A6-spezifischen Antikörper. Wie aus Abbildung 4.17 ersichtlich, konnte für Linie # 3c ein Signal der relativen Molekülmasse von etwa 50000 detektiert werden. Die beiden anderen Linien sowie der als Negativ-Kontrolle aufgetragene *N. tabacum* Wildtyp zeigte kein Signal.

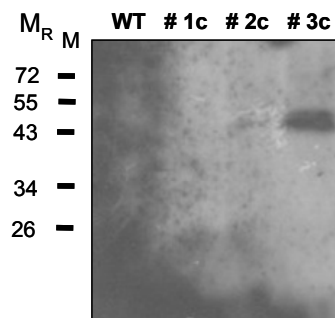


Abbildung 4.17. Immunoblot transgener p2A6opt-4701-Linien. Aufgetragen wurden 20 µl Blattextrakt der Linien. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines 2A6-Antikörpers. M_R: Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

Da es doch gelungen war, für Linie # 3c die Synthese des Proteins nachzuweisen, wurde mit Indol versetztes Blattmaterial dieser Linien einer Dünnschichtchromatographie unterzogen. Wie zuvor mehrmals beschrieben wurden 200 mg Blattmaterial extrahiert und der Überstand auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Die Bildung von Indol konnte nur für den aufgetragenen Standard Indican gezeigt werden. Auch die Extraktion einer größeren Menge an Blattmaterial lieferte kein Ergebnis. Nun stellt sich die Frage, ob diese Pflanzen überhaupt transgen sind beziehungsweise waren. Erneut wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, die zeigte, dass das Transgen *2A6opt* nach wie vor vorhanden war. Da aber weder die Homoplasmie noch die RNA-Synthese nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass das Signal des Immunoblot kein spezifisches 2A6-Signal ist. Aus bisher unbekannten Gründen kann das eingebrachte Transgen nicht nachgewiesen werden.

4.3 Erzeugung transplastomer pBX1-p2A6opt-4701-Linien

Parallel zur alleinigen Expression des Gens *2A6opt*, sollten in einem weiteren Versuch Doppeltransformatanten durch Transformation von bereits transgenen BX1-Pflanzen erzeugt und charakterisiert werden.

4.3.1 pBX1-Linien

Um das Substrat Indol für das in den Chloroplasten zu exprimierende *2A6opt* zur Verfügung zu stellen, wurden nun Tabakpflanzen transformiert, welche kerncodiert das Enzym BX1 aus Mais (Frey *et al.*, 2000) produzieren. Diese Pflanzen enthielten das Plasmid pBAR:BX1, ein Derivat des pGPTV-BAR Plasmids (Becker *et al.*, 1992). Das *bx1*-Gen steht hier unter der Kontrolle des 35S-Promoters, das BX1-Enzym wiederum besitzt eine Targetingsequenz, welche das Protein in den Chloroplasten leitet.

Die Samen der vorhandenen pBAR:BX1-Linien # 10, # 14 und # 15 wurden auf steriles MS-Medium, das zur Selektion Phosphinotricin enthielt, ausgebracht. Bereits nach wenigen Wochen verströmten die Pflanzen einen starken Geruch. Dieser typische Indol-Geruch war ein Hinweis darauf, dass das Enzym BX1 in aktiver Form vorliegt und freies Indol synthetisiert.

4.3.2 Stabile Chloroplastentransformation

Wie unter 3.6.1 beschrieben wurden 10 Blätter der *N. tabacum* Linie pBAR:BX1 # 14 transformiert, in kleine Blattstücke geschnitten und für zwei Tage auf RMOP-Medium kultiviert. Zur Selektion transgener Zellen diente RMOP-Medium mit Phosphinotricin (für BX1) und Spectinomycin (für *2A6opt*). Nach etwa 6-8 Wochen bildeten sich fünf Kalluskulturen, die vom übrigen Gewebe abgetrennt und bis zur Ausbildung vollständiger Pflänzchen weiter kultiviert wurden. Für eine DNA-Isolierung wurden 100 mg Blattmaterial der Linien pBX1-p2A6opt-4701 # 1, # 2, # 3, # 4 und # 5 geerntet. Die Überprüfung auf Vorhandensein der Transgene erfolgte mittels PCR unter Verwendung der jeweiligen genspezifischen Primer, *2A6opt* 101 und *2A6opt* 201 für *2A6opt* und BX1 110 und BX1 210 für *bx1*. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten der Größe 500 bp (internes Fragment für *2A6opt*) und von DNA-Fragmenten der Größe 700 bp (internes Fragment für *bx1*) zeigte die erfolgreiche Integration der Transgene für alle getesteten Linien. Diese fünf Linien standen nun für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

4.3.3 Identifizierung homoplastischer Pflanzen

Die getesteten Linien wurden weiteren Regenerationszyklen unterworfen, um die vorliegenden Wildtyp-Genome zu verdrängen. Zum Nachweis homoplastischer Pflanzen wurde erneut aus 100 mg Blattmaterial jeder Linie der Generation b die DNA isoliert und jeweils 2 µg mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. Wie bereits unter 4.2.3 beschrieben, sollte durch den Verdau ein 4400 bp Fragment für das Wildtyp-Genom entstehen und ein größeres Fragment von 7900 bp für transgene Genome (Abbildung 4.18A und 4.18.B). Das innerhalb dieser Fragmente liegende plastidäre *psaB*-Gen kann dann mithilfe einer komplementären Sonde detektiert werden. Die über Nacht verdauten DNA-Proben wurden auf eine Membran transferiert und mit der Sonde hybridisiert.

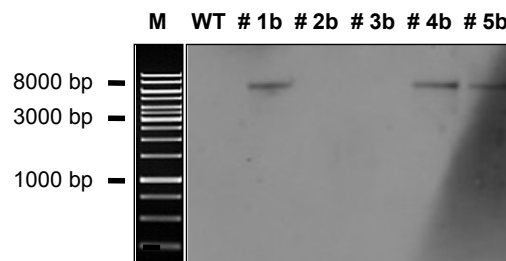


Abbildung 4.18. Ergebnis der RFLP-Analyse transplastomer pBX1-p2A6opt-4701-Linien. Die Identifizierung homoplastischer Linien erfolgte unter Verwendung der *psaB*-Sonde. M: 1 kb DNA-Leiter.

Abbildung 4.18 zeigt das Ergebnis des Southern Blot nach Entwicklung des Röntgenfilms. Die detektierten Signale entsprechen allerdings nicht den Erwartungen. Zunächst konnte für die verdaute plastidäre Wildtyp-DNA kein charakteristisches Signal von 4400 bp nachgewiesen werden. Für Linie # 1b, # 4b und # 5b wurde ein dem Transgen entsprechendes Signal von ca. 8000 bp detektiert. Da kein zusätzliches, kleineres Fragment nachgewiesen wurde, sollten diese Linien bereits homoplastisch sein. Da aber generell kein Wildtyp-Fragment detektiert werden konnte, lässt sich diesbezüglich keine genaue Aussage treffen.

4.3.4 Nachweis der RNA- und Proteinsynthese

Die scheinbar homoplastischen Pflanzen wurden etwa 3 Wochen weiter kultiviert, um genügend Blattmaterial für nachfolgende Untersuchungen zu erhalten. Zunächst wurde die

RNA erneut aus 100 mg Blattmaterial isoliert, zur Auftrennung auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Methylenblau angefärbt (Abbildung 4.19A). Die Hybridisierung/Detektion der RNA erfolgte mit 4 µl der zuvor hergestellten 2A6opt-Sonde. Für die Linien # 5b, # 4b und # 1b konnte eine starke Transkription des 1500 bp großen Transgens nachgewiesen werden. Linie # 2b und # 3b zeigten keine Transkription. Für die als Negativ-Kontrolle eingesetzte Wildtyp-RNA wurde wie erwartet kein spezifisches Signal detektiert (Abbildung 4.19B).

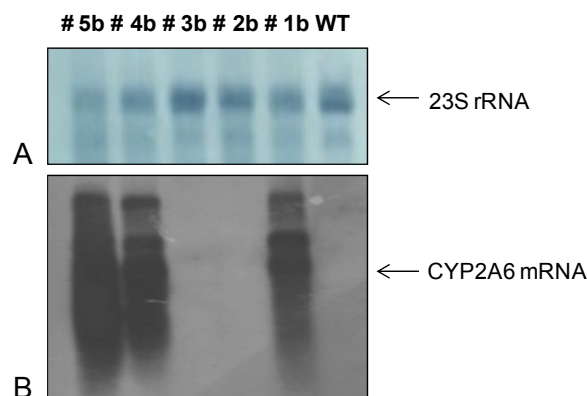


Abbildung 4.19. RNA-Blot der transplastomen pBX1-p2A6opt-4701-Linien. A) Gefärbte 23S-rRNA. B) Detektion des 1500 bp großen 2A6opt-Transkripts mittels spezifischer Sonde.

Im Folgenden wurden alle Linien hinsichtlich der Bildung des Proteins CYP2A6 untersucht. Dazu wurden 100 mg Blattmaterial mit SDS-Probenpuffer erhitzt und auf eine SDS-Page aufgetragen. Die Gesamt-Proteine wurden im Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Detektion der CYP2A6-Proteine erfolgte unter Verwendung des 2A6-soezifischen Antikörpers. Trotz der sehr starken Transkription konnte keine Synthese von CYP2A6 nachgewiesen werden. Die Vermutung liegt nahe, dass auch hier wieder kaum beziehungsweise sehr geringe Mengen an Protein gebildet werden, die somit nicht nachgewiesen werden können.

4.3.5 Aktivitätsnachweis von CYP2A6

Trotz der Annahme, dass nur geringe Mengen an Protein vorlagen, wurde dennoch der Aktivitätsnachweis mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Da diese Pflanzen das Indol-produzierende Enzym BX1 exprimieren, mussten die Pflanzen in diesem Fall nicht mit Indol versetzt werden. 200 mg Blattmaterial der Linien # 1b, # 2b, # 4b und # 5b wurden mit

Aceton extrahiert und die in Methanol aufgenommenen Rückstände wurden nach Vakuumzentrifugation auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Als Standard dienten 20 µl Indican. Nach erfolgtem Lauf und Besprühen der Platte mit Salzsäure konnten schwache blaue Zonen für die Linien, für die auch eine starke Transkription nachgewiesen werden konnte, detektiert werden. Die nachgewiesenen indigoiden Pigmente waren im Vergleich zum Standard Indican so gering, dass sie kaum zu erkennen waren (Abbildung 4.20). Trotzdem bedeutet dieses Ergebnis, dass das durch BX1 gebildete Indol hydroxyliert wird und in der Pflanze gespeichert wird. Somit ist das in jungen Pflanzen gebildete Protein aktiv. Trotz allem scheint die Expression im Chloroplastengenom zu keiner gesteigerten, stabilen Proteinbildung zu führen. Das Problem ist in diesem Fall vermutlich nicht auf einen frühzeitigen RNA-Abbau zurückzuführen, sondern eher auf einen schnellen Proteinabbau. In weiteren Untersuchungen müssten zunächst die Gründe für dieses Phänomen geklärt werden.

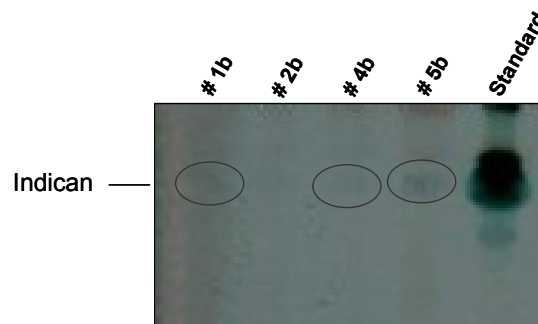


Abbildung 4.20. Ergebnis der Dünnschichtchromatographie. Aufgetragen wurden 20 µl Blattextrakt der pBX1-p2A6opt-4701-Linien sowie 20 µl des Standards. Nach Besprühen der Platte mit HCl konnten für Linie # 1b, # 4b und # 5b indigoide Pigmente detektiert werden.

4.4 Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana* NADPH-Reduktase ATR2

In dieser Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, in wie weit pflanzliche NADPH-Reduktasen im Chloroplasten als Elektronendonator für das humane Cytochrom-P450-Enzym dienen können. Dabei stellt das Enzym ATR2 aus *Arabidopsis thaliana* einen potentiellen Kandidaten für eine Chloroplasten-lokalisierte Reduktase dar und sollte hier bezüglich Lokalisation und Funktion charakterisiert werden.

Sequenzanalysen zeigten, dass die Reduktase ATR2, im Gegensatz zur Reduktase ATR1, am N-Terminus eine Signalsequenz trägt, welche als Chloroplasten-Targeting-Sequenz fungieren soll. Dieser sehr hohe Serin-Anteil innerhalb der ersten 45 Aminosäuren legt die Vermutung nahe, dass die zwei Reduktasen in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind, ATR1 im Cytosol und ATR2 in den Chloroplasten (Hull *et al.*, 2000). Abbildung 4.21 zeigt den Sequenzvergleich der beiden Reduktasen.

| | |
|------|---|
| ATR2 | MSSSSSSSTSMIDLMAAIIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIVMLVWRR.... |
| ATR1 | MTSALYASDLFKQLKSIMGTDLSDDVVLVIATTSLALVAGFVVLLWKKT.... |

Abbildung 4.21. Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Reduktasen ATR1 und ATR2 aus *Arabidopsis thaliana*.

Beim Betrachten dieser beiden Sequenzen fällt weiterhin auf, dass die Reduktase ATR2 eine weitere charakteristische Aminosäurenabfolge aufweist. Diese meist aus vier Aminosäuren bestehende Lipobox, im Fall von ATR2 die Abfolge LIGC (in Abbildung 4.21 rot gekennzeichnet), ist ein typisches Merkmal bakterieller Lipoproteine. Diese Sequenz dient als Erkennungssignal und führt in Bakterien nach Entfernen der N-terminalen Signalsequenz zu einer postrationalen Lipidierung von Proteinen (Babu *et al.*, 2002). Weitere Sequenzanalysen verdeutlichten, dass auch andere pflanzliche Reduktasen diese Lipobox aufweisen, dazu zählen zum Beispiel Reduktasen der Pflanzengattungen *Artemisia* und *Eschscholzia*.

Um diese Vorhersagen und Vermutungen bezüglich der Lokalisation und einer eventuellen Lipidierung des Proteins ATR2 zu überprüfen, sollten unterschiedliche Versionen des Gens sowohl bakteriell als auch transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert werden. Um die Lokalisation zweifelsfrei zu klären, sollten die Varianten mit dem Reporterprotein YFP fusioniert werden. Fluoreszierende Proteine eignen sich sehr gut als Reporterproteine, da die Expression des Fusionsproteins so besser verfolgt werden kann. Das aus der Quale *Aequorea victoria* stammende green fluorescent protein (GFP) wurde 1960 entdeckt und

besitzt ein Emissionsmaximum bei 508 nm. Durch Substitution einzelner Aminosäuren können verschiedene fluoreszierende GFP-Varianten erzeugt werden (Brandizzi *et al.*, 2002; Hanton & Brandizzi, 2006). Das in dieser Arbeit verwendete Reporterprotein YFP zeigt ein Emissionsspektrum bei 527 nm und liegt somit im gelben Spektralbereich. Desweiteren war die Fusion in diesem Fall hilfreich, da kein ATR2-Antikörper zur Verfügung stand, sodass der Proteinnachweis mittels YFP-Antikörper erfolgen konnte.

4.4.1 Klonierung der Reduktase ATR2 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolierung des für die NADPH-Reduktase ATR2 kodierenden Gens standen *Saccharomyces cerevisiae* Zellen des Stammes WAT21 zur Verfügung. Diese wurden von Prof. D. Pompon aus Frankreich zur Verfügung gestellt (Urban *et al.*, 1990; Pompon *et al.*, 1996). Aus einer Übernachtskultur des Hefestammes WAT21 wurde nach einem Protokoll von D. Amberg (Amberg, 2002) genomische DNA isoliert. Zur Amplifikation der entsprechenden cDNA mittels PCR wurden die Primer ATR2 101 for und ATR2 201 rev eingesetzt, die zuvor anhand der ATR2-Sequenz aus einer *Arabidopsis*-Datenbank entwickelt wurden. Als Template dienten 10 µg der isolierten genomischen DNA. Nach erfolgter Elektrophorese konnten unter UV-Licht DNA-Fragmente der Größe 2000 bp detektiert werden. Diese wurden aus dem Gel eluiert, in den Vektor pCR2.1 ligiert und kompetente *E. coli* Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Positiv getestete Bakterienkolonien wurden über Nacht in 4 ml LB-Flüssigmedium kultiviert, und die Plasmide isoliert. Ein Kontrollverdau zeigte den erfolgreichen Einbau der amplifizierten cDNA-Sequenz, welche anschließend zur Überprüfung sequenziert wurde. Die Überprüfung der Sequenz erfolgte durch die Firma Seqlab.

Zur näheren Charakterisierung des Gens beziehungsweise des Proteins ATR2 sollten zusätzlich zum Volllänge-Gen drei weitere, kürzere Varianten mit daraus resultierender veränderter oder entfernter Signalsequenz erzeugt werden. Anhand der ATR2-Sequenz wurden drei neue forward-Primer (ATR2 102; ATR2 103; ATR2 104) entwickelt, die zusammen mit dem zuvor erzeugten Plasmid pATR2-1311 als Template und dem reverse-Primer ATR2 201 in weiteren PCR-Reaktionen eingesetzt wurden. Nach Elektrophorese konnten die drei amplifizierten Fragmente aus dem Gel eluiert und ebenfalls in den Vektor pCR2.1 ligiert werden. Die Nomenklatur der mit den entsprechenden Primern erzeugten Konstrukte ist in Tabelle 4.1 zu sehen. Variante pATR2-1312 enthält eine um 14 Aminosäuren kürzere Chloroplastenlokalisationssequenz, die Varianten pATR2-1313 und pATR2-1314 zeichnen sich durch das Fehlen dieser Sequenz aus.

Tabelle 4.1. Nomenklatur der ATR2-Varianten. Abhängig von der Länge der Signalsequenz wurden die unterschiedlichen Varianten mit den Ziffern 11, 12, 13 und 14 versehen. Ziffer 11 steht für das Gen mit der längsten bzw. vollständigen Sequenz, Ziffer 14 steht für das Gen mit kürzester Sequenz.

| Nomenklatur | Vektor | ATR2-Variante |
|-------------|--------|-------------------------|
| pATR2-1311 | pCR2.1 | ATR2-11 (Volllänge-Gen) |
| pATR2-1312 | pCR2.1 | ATR2-12 |
| pATR2-1313 | pCR2.1 | ATR2-13 |
| pATR2-1314 | pCR2.1 | ATR2-14 |

4.4.2 Bakterielle Expression der Reduktase ATR2

Wie zuvor beschrieben, ergab die Sequenzanalyse der Reduktase ATR2, dass dieses Protein im Vergleich zur cytosolischen Reduktase ATR1 eine für Bakterien typische Lipobox aufweist. Aufgrund dessen sollte das Protein zunächst in Bakterien exprimiert und charakterisiert werden. Wird das Protein tatsächlich nach Entfernung der N-terminalen Sequenz in Bakterienzellen lipidiert, könnte dieses Lipidierungsmotiv vermutlich auch in Pflanzen zu einer Membranassoziation führen.

Das für eine Fusion benötigte Reportergen *yfp* wurde durch Restriktionsverdau eines von A. Hennig erzeugten Plasmids (pYFP-1433) mit den Enzymen *Xho*I und *Sac*I erhalten. Die vier ATR2-Varianten wurden mit den Enzymen *Nco*I und *Xho*I verdaut und nach Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert. Der bakterielle Expressionsvektor pSE380 wurde mit den Enzymen *Nco*I und *Sac*I linearisiert. Nach Ligation der drei Fragmente über Nacht wurden kompetente *E. coli* Zellen mit den Ligationsansätzen transformiert. Aus je vier Bakterienklonen wurden die Plasmide isoliert und der Einbau des Fusionsproduktes mittels Restriktionsverdau überprüft. Es zeigte sich, dass die Ligation des Volllänge-Gens ATR2-11 in den Expressionsvektor nicht erfolgreich war. Auch nach mehrfacher Ligation und Transformation konnte kein positives Ergebnis erzielt werden. Die erfolgreiche Ligation der drei anderen ATR2:YFP-Varianten in den Vektor pSE380 wurde durch den Kontrollverdau bestätigt. Für weitere Experimente wurden ausschließlich die drei kürzeren ATR2:YFP-Varianten verwendet, deren Nomenklatur Tabelle 4.2 zu entnehmen ist.

Tabelle 4.2. Nomenklatur der für eine bakterielle Expression verwendeten Plasmide. Die Tabelle zeigt die Nomenklatur der Varianten ATR2:YFP-12, -13, und -14 im Expressionsvektor pSE380 (Ziffer 24).

| Nomenklatur | Vektor | ATR2:YFP -Variante |
|----------------|--------|--------------------|
| pATR2:YFP-2412 | pSE380 | ATR2-12 |
| pATR2:YFP-2413 | pSE380 | ATR2-13 |
| pATR2:YFP-2414 | pSE380 | ATR2-14 |

Für die bakterielle Expression wurde je ein positiv getesteter Klon über Nacht in 4 ml frischem LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Da die Proteinexpression im Vektor pSE380 nicht mit IPTG induziert werden musste, konnten die Kulturen direkt am nächsten Tag aufgearbeitet werden. Dazu wurden die Zellen pelletiert und 6 x 30 sek unter Verwendung eines Ultraschallstabs aufgeschlossen. Nach Zentrifugation konnten 20 µl der Überstände auf ein SDS-Gel aufgetragen werden. Als Negativ-Kontrolle dienten Bakterien, die den Expressionsvektor ohne Insert tragen, als Positiv-Kontrolle wurden Bakterien verwendet, die drei verschiedene YFP-Varianten (YFP1.1a; YFP1.1b; YFP1.1c) exprimieren, sowie eine Bakterienkultur, die eine OspA:YFP-Fusion exprimiert. Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot unter Verwendung GFP-spezifischer Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 4.22 ist das Ergebnis des Western Blots nach Entwicklung des Röntgenfilms zu sehen. Bei allen drei ATR2:YFP-Varianten konnten nach einer Stunde schwache Signale detektiert werden, die der relativen Molekülmasse des Fusionsproteins von 110000 entsprachen. Die als Kontrolle verwendete OspA:YFP-Fusion mit einer Molekülmasse von etwa 60000 zeigte ebenfalls ein schwaches, spezifisches YFP-Signal. Die drei verschiedenen YFP-Varianten mit einer Molekülmasse von 30000 konnten ebenfalls detektiert werden. Trotzdem war diese Proteinexpression zu gering und da die verschiedenen Varianten zusätzlich zur bakteriellen Expression transient in *Nicotiana tabacum* exprimiert werden sollten, schienen diese Konstrukte nicht für eine transiente Expression geeignet zu sein. Ein limitierender Faktor der Expression könnte die Größe bzw. die Molekülmasse des Fusionsproteins von 110000 sein, sodass auch die transiente Expression nicht das gewünschte Ergebnis erzielen könnte. Aus diesen Gründen wurde mit den bisher erzeugten ATR2:YFP-Varianten nicht weiter gearbeitet. In den folgenden Untersuchungen sollte ausschließlich der N-terminale Bereich des Gens *ATR2* mit *yfp* fusioniert und anschließend in Bakterien und Pflanzen exprimiert werden.

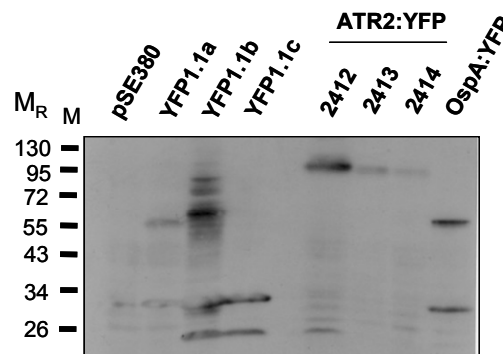


Abbildung 4.22. Immunoblot verschiedener YFP-Fusionsproteine. Zum Nachweis der Expression der ATR2:YFP-Varianten erfolgte die Detektion der Proteine unter Verwendung eines spezifischen GFP-Antikörpers. Als Positiv-Kontrolle dienten drei, aus *E. coli* gereinigte YFP-Varianten sowie eine OspA:YFP-Fusion, die ebenfalls aus *E. coli* aufgereinigt wurde. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

4.5 Charakterisierung der NADPH-Reduktase ATR2 durch Expression des N-terminalen 5'-Sequenzabschnittes

Wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, konnte die ATR2:YFP-Fusion unter Verwendung von Bakterien als Expressionssystem nicht in ausreichender Menge produziert werden. Dies lässt darauf schließen, dass vermutlich auch eine transiente Expression in *Nicotiana benthamiana* nicht die gewünschten Ergebnisse erzielt. Ein störender Faktor bei einer transienten Expression in Pflanzen ist vermutlich die Größe des zu exprimierenden Gens.

Zur Untersuchung der Lokalisation und der Lipidmodifikation der NADPH-Reduktase ATR2 ist es jedoch nicht notwendig, das vollständige Protein zu exprimieren, da die Funktionalität nicht gegeben sein muss. Es ist deshalb möglich, einen relativ kurzen, N-terminalen Sequenzabschnitt des Gens *ATR2* mit *yfp* zu fusionieren und anschließend das entstandene Fusionsprotein näher zu charakterisieren. Da die Reduktase ATR2 nach Sequenzanalyse eine N-terminale Chloroplastenlokalisationssequenz von 45 Aminosäuren aufweist, wurden in dieser Arbeit die ersten 250 bp des 5'-Sequenzabschnittes des Reduktase-Gens zur weiteren Klonierung und Expression verwendet.

4.5.1 Klonierung der 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten

Wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, sollten auch hier zusätzlich zum vollständigen Gen drei kürzere Varianten mit unvollständiger oder fehlender N-terminaler Signalsequenz erzeugt

werden. Zusätzlich sollten entsprechend mutierte Varianten kloniert werden, deren Lipobox durch den Austausch des Cystein gegen ein Glycin verändert wurde. Zur Klonierung der verschiedenen 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten wurde ein von der Firma Mr. Gene synthetisierter Vektor bezogen, der beide Gene, 5'ATR2 und 5'ATR2mut, trägt (Vektorkarte im Anhang).

Es sollten fünf verschiedene Varianten des Gens 5'ATR2 (Variante 5'ATR2-21L wurde nur für die transiente Expression verwendet) und vier verschiedene Varianten des Gens 5'ATR2mutiert kloniert werden (Abbildung 4.23). Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation der verschiedenen Genvarianten, war es auch hier notwendig, diese mit *yfp* als Reportergen zu fusionieren.

| | |
|--------------|---|
| 5'ATR2-21L | MSSSSSSSTSMIDLMAAIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIV... |
| 5'ATR2-11 | MASSSSSSTSMIDLMAAIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIV... |
| 5'ATR2-12 | MAAIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIV... |
| 5'ATR2-13 | MLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIV... |
| 5'ATR2-14 | MIVTTSIAVLIGCIV... |
| 5'ATR2mut-11 | MASSSSSSTSMIDLMAAIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGGIV... |
| 5'ATR2mut-12 | MAAIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGGIV... |
| 5'ATR2mut-13 | MLIENRQFAMIVTTSIAVLIGGIV... |
| 5'ATR2mut-14 | MIVTTSIAVLIGGIV... |

Abbildung 4.23. Aminosäuresequenzen der zu klonierenden 5'ATR2 Genvarianten.

Das Konstrukt 5'ATR2-11 wurde direkt mittels der Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* aus dem Vektor geschnitten, das Restriktionsprodukt der Größe 250 bp aus dem Gel eluiert und für die anschließende Ligation in den mit *NcoI* und *SacI* linearisierten, bakteriellen Expressionsvektor pSE380 verwendet. Das für alle Konstrukte benötigte Reportergen *yfp*, welches eine Größe von 750 bp aufweist, wurde durch Verdau des bereits vorhandenen

Plasmids pYFP-1433 mit den Endonucleasen *XhoI* und *SacI* erhalten und ebenfalls für die Ligation verwendet. Die mutierte Variante 5'ATR2mut-11 wurde mittels *NcoI* und *SaII* aus dem Vektor geschnitten, über eine *XhoI*-Schnittstelle mit dem Reportergen *yfp* fusioniert und ebenfalls in den mit *NcoI* und *SacI* linearisierten Vektor ligiert. Das Schema zur Fusion der 5'ATR2/5'ATR2mut-Varianten mit *yfp* ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

Nach Ligation der drei Fragmente wurde der Ansatz in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positiv getestete Bakterienkolonien wurden über Nacht in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert und einer Minipräparation unterzogen. Der Restriktionsverdau der isolierten Plasmide (p5'ATR2:YFP-2411/p5'ATR2mut:YFP-2411) mit den Enzymen *NcoI* und *SacI* zeigte den erfolgreichen Einbau der Inserts.

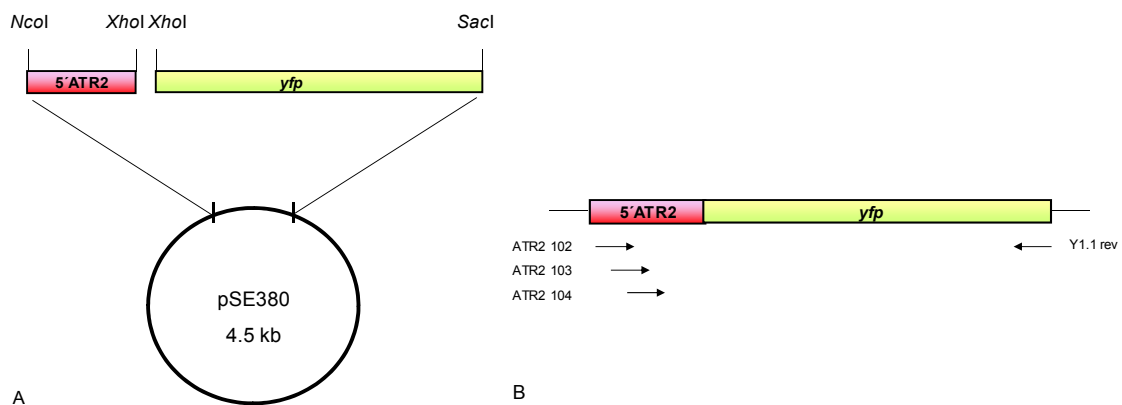


Abbildung 4.24. Klonierungsschema der ATR2:YFP-Konstrukte. A) Fusion von ATR2 und *yfp* über eine *XhoI*-Schnittstelle und Klonierung in den Expressionsvektor pSE380. B) Schema zur Erzeugung der verkürzten Varianten unter Verwendung genspezifischer ATR2-Primer.

Die drei verkürzten 5'ATR2-Varianten sowie die drei verkürzten 5'ATR2mut-Varianten konnten nun durch Amplifikation mit den entsprechenden Primern und unter Verwendung der Plasmide p5'ATR2:YFP-2411 und p5'ATR2mut:YFP-2411 als Template erzeugt werden. Die Amplifikation der Varianten 5'ATR2:YFP-12 und 5'ATR2mut:YFP-12 erfolgte mit den Primern ATR2-102 und Y1.1 reverse, Varianten 5'ATR2:YFP-13 und 5'ATR2mut:YFP-13 wurde mittels der Primer ATR2-103 und Y1.1 reverse erzeugt und die Varianten 5'ATR2:YFP-14 und 5'ATR2mut:YFP-14 unter Verwendung der Primer ATR2-104 und Y1.1 reverse. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die jeweiligen Fragmente der Größe 1000 bp aus dem Gel eluiert, in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert und in *E. coli* Zellen transformiert. Die Nomenklatur der nun für weitere Experimente zur Verfügung stehenden Plasmide ist Tabelle 4.3 zu entnehmen.

Tabelle 4.3. Nomenklatur der 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten. Abhängig von der Länge der Signalsequenz wurden die unterschiedlichen Varianten mit den Ziffern 11, 12, 13 und 14 versehen. Ziffer 11 steht für das Gen mit der längsten bzw. vollständigen Sequenz, Ziffer 14 steht für das Gen mit kürzester Sequenz.

| Nomenklatur | Vektor | 5' ATR2:YFP-Variante |
|----------------------|----------|----------------------|
| p5' ATR2:YFP-2411 | pSE380 | 5' ATR2:YFP-11 |
| p5' ATR2:YFP-1412 | pCRblunt | 5' ATR2:YFP-12 |
| p5' ATR2:YFP-1413 | pCRblunt | 5' ATR2:YFP-13 |
| p5' ATR2:YFP-1414 | pCRblunt | 5' ATR2:YFP-14 |
| p5' ATR2mut:YFP-2411 | pSE380 | 5' ATR2mut:YFP-11 |
| p5' ATR2mut:YFP-1412 | pCRblunt | 5' ATR2mut:YFP-12 |
| p5' ATR2mut:YFP-1413 | pCRblunt | 5' ATR2mut:YFP-13 |
| p5' ATR2mut:YFP-1414 | pCRblunt | 5' ATR2mut:YFP-14 |

4.5.2 Klonierung und bakterielle Expression der 5'ATR2/5'ATR2mut-Varianten

Die Konstrukte p5'ATR2:YFP-2411 und p5'ATR2mut:YFP-2411 konnten direkt für eine Transformation von geeigneten Bakterienzellen verwendet werden. Die sechs kürzeren Varianten mussten zuvor ebenfalls in den bakteriellen Expressionsvektor pSE380 kloniert werden. Dazu wurden die Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Sac*I verdaut, die Fragmente aus dem Gel eluiert und in den mit *Nco*I und *Sac*I linearisierten Vektor ligiert. Die Ligationsansätze wurden in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und über Nacht zur Selektion auf Agarplatten mit Ampicillin kultiviert. Aus positiv getesteten Bakterienklonen wurde das Plasmid isoliert und mittels Restriktionsverdau der korrekte Einbau des Inserts überprüft. Alle getesteten Klone enthielten das rekombinante Plasmid und konnten für eine Transformation von kompetenten *E. coli* Origami-Zellen verwendet werden. Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers untersucht. Es konnte jedoch zu keiner Zeit ein entsprechendes Signal auf den Röntgenfilmen detektiert werden. Aus diesem Grund sollten die verschiedenen Varianten in einen anderen, induzierbaren Expressionsvektor kloniert werden. Zur Verfügung stand der bakterielle Expressionsvektor pQE60. Die vier 5'ATR2:YFP-Varianten sowie die vier 5'ATR2mut:YFP-Varianten wurden mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III aus dem Vektor pSE380 geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pQE60 ligiert. Kompetente *E. coli* Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und die Plasmide nach erfolgreichem Colony Screening aus den Bakterienkulturen isoliert. Der

Restriktionsverdau mit den Enzymen *Nco*I und *Hind*III bestätigte den korrekten Einbau der acht Genvarianten, deren Nomenklatur in Tabelle 4.4 zu sehen ist. Die Plasmide standen nun für die bakterielle Expression zur Verfügung.

Tabelle 4.4. Nomenklatur der 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten. Tabelle 4.4 zeigt die Nomenklatur der Varianten ATR2:YFP-11, -12, -13, und -14 sowie der zugehörigen mutierten Varianten, die in den Expressionsvektor pQE60 kloniert wurden.

| Nomenklatur | Vektor | 5' ATR2:YFP-Variante |
|----------------------|--------|----------------------|
| p5' ATR2:YFP-2111 | pQE60 | 5' ATR2:YFP-11 |
| p5' ATR2:YFP-2112 | pQE60 | 5' ATR2:YFP-12 |
| p5' ATR2:YFP-2113 | pQE60 | 5' ATR2:YFP-13 |
| p5' ATR2:YFP-2114 | pQE60 | 5' ATR2:YFP-14 |
| p5' ATR2mut:YFP-2111 | pQE60 | 5' ATR2mut:YFP-11 |
| p5' ATR2mut:YFP-2112 | pQE60 | 5' ATR2mut:YFP-12 |
| p5' ATR2mut:YFP-2113 | pQE60 | 5' ATR2mut:YFP-13 |
| p5' ATR2mut:YFP-2114 | pQE60 | 5' ATR2mut:YFP-14 |

Die acht verschiedenen Plasmide wurden in kompetente *E. coli* Origami-Zellen transformiert und zur Selektion auf LB-Platten mit Tetracyclin, Kanamycin und Ampicillin kultiviert. Mehrere Bakterienklone wurden auf das Vorhanden sein der rekombinanten Plasmide überprüft. Da die Transformation aller Konstrukte erfolgreich war, wurde je ein Klon über Nacht in 4 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Am folgenden Tag wurde jeweils 1 ml der Kultur in frisches Medium überführt, die Zellen für 4 h inkubiert und diese zur Induktion der Expression mit 1M IPTG versetzt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte über Nacht. Die Kulturen wurden wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben aufgearbeitet, die Proteinextrakte über eine SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Synthese der Fusionsproteine in den Bakterien wurde unter Verwendung GFP-spezifischer Antikörper nachgewiesen. Nach Detektion des Protein 5'ATR2:YFP-2111 konnten Signale, die der relativen Molekülmasse von ca. 40000 und somit der Molekülmasse des Fusionsproteins entsprachen, sowohl im Bakterienlysats (Ü), als auch im Eluat (E) detektiert werden. Die Detektion des Proteins 5'ATR2:YFP-2112 lieferte ähnliche Ergebnisse. Das Fusionsprotein der Molekülmasse von ca. 38000 konnte sowohl im Lysat als auch in der Eluatfraktion nachgewiesen werden. Das detektierte Signal der Waschfraktion 1 zeigt, dass während der Aufreinigung ein Großteil des Proteins verloren gegangen ist (Abbildung 4.25). Im Gegensatz dazu scheinen die Fusionsproteine 5'ATR2:YFP-2113 und 5'ATR2:YFP-2114 sehr schwach exprimiert zu sein. Es konnte ein

schwaches Signal im Bakterienlysats für 5'ATR2:YFP-2113 (M_R : 35000) und ebenfalls ein sehr schwaches Signal in der Waschfraktion 1 für 5'ATR2:YFP-2114 (M_R : 33000) detektiert werden. In den Eluatfraktionen konnten die entsprechenden Proteine auch nach mehrmaliger Wiederholung der Aufreinigung nicht in größerer Menge nachgewiesen werden (Abbildung 4.25). Im Vergleich dazu zeigte die Detektion des fluoreszierenden Proteins CFP, welches als Positiv-Kontrolle ebenfalls in Origami-Zellen exprimiert wurde, ein starkes Signal bei einer relativen Molekülmasse von 30000 (Abbildung 4.26). Trotzdem kann anhand dieser Ergebnisse die Aussage getroffen werden, dass alle vier 5'ATR2:YFP-Varianten in den Zellen des Bakterienstammes Origami exprimiert werden konnten. Nach Entwicklung der Röntgenfilme konnten ebenso für die exprimierten mutierten Varianten 5'ATR2mut:YFP-2111 und 5'ATR2mut:YFP-2112 Signale, die der relativen Molekülmasse der rekombinanten Proteine von 40000 bzw. 38000 entsprachen, detektiert werden. Auch hier zeigte sich das stärkste Signal in den Eluatfraktionen (Abbildung 4.26). Die Expression der Varianten 5'ATR2mut:YFP-2113 und 5'ATR2mut:YFP-2114 konnte wie auch die Expression der zugehörigen nicht mutierten Varianten zwar nachgewiesen werden, doch war auch hier die Expressionsrate eher gering. Es konnten schwache Banden in der Eluat- sowie der Waschfraktion 2 detektiert werden (Abbildung 4.27). Im Vergleich dazu konnten große Mengen des Proteins CFP, das als Positiv-Kontrolle fungierte, nachgewiesen werden (Abbildung 4.26).

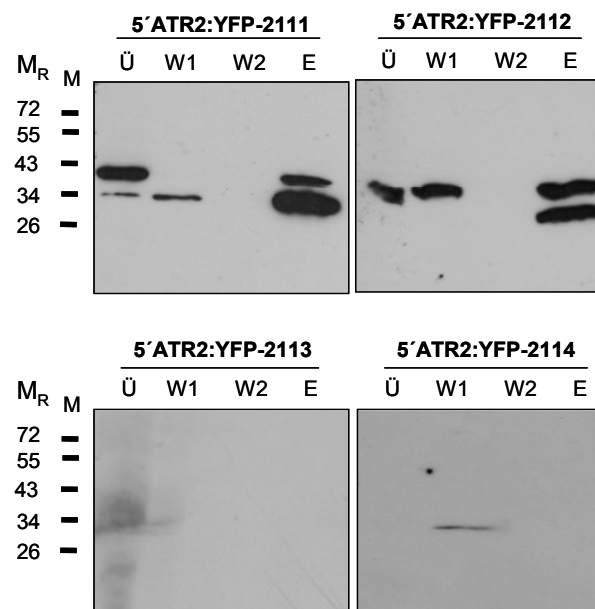


Abbildung 4.25. Immunodetektion der aus Bakterien aufgereinigten Fusionsproteine 5'ATR2:YFP-2111, 5'ATR2:YFP-2112, 5'ATR2:YFP-2113 und 5'ATR2:YFP-2114. Aufgetragen wurden 20 µl Bakterienlysats (Ü) nach Aufschluß der Zellen mittels Quarzsand, je 20 µl der Waschphasen W1 und W2 sowie 20 µl des Eluats E nach Aufreinigung der Bakterienlysate über 20 mg des Protino-Säulenmaterials. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines GFP-Antikörpers. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

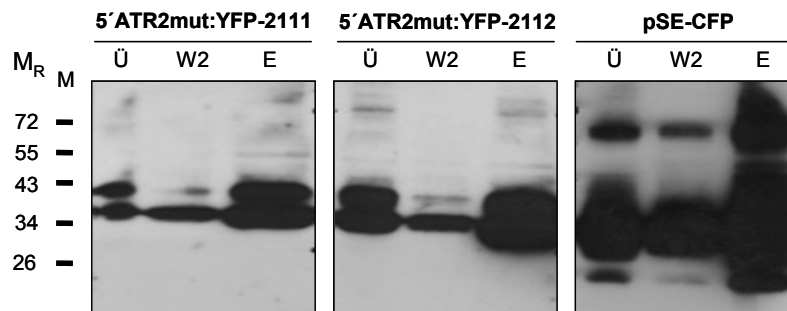


Abbildung 4.26. Immunodetektion der aus Bakterien aufgereinigten Fusionsproteine 5'ATR2mut:YFP-2111 und 5'ATR2mut:YFP-2112. Aufgetragen wurden 20 µl Bakterienlysate (Ü) nach Aufschluß der Zellen mittels Quarzsand, 20 µl der Waschphase W2 sowie 20 µl des Eluats E nach Aufreinigung der Bakterienlysate über 20 mg Protino-Säulenmaterial. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines GFP-Antikörpers. M_R: Relative Molekülmasse x 10³ und zugehörige Markerbanden (M).

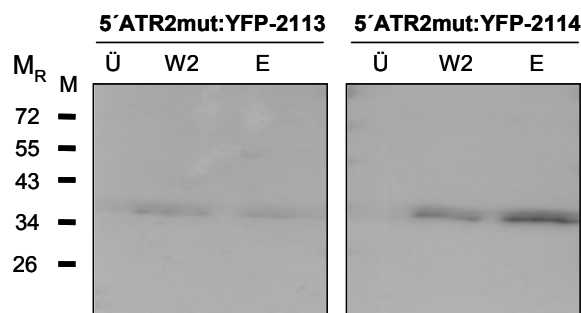


Abbildung 4.27. Immunodetektion der aus Bakterien aufgereinigten Fusionsproteine 5'ATR2mut:YFP-2113 und 5'ATR2mut:YFP-2114. Aufgetragen wurden 20 µl Bakterienlysate (Ü) nach Aufschluß der Zellen mittels Quarzsand, 20 µl der Waschphase W2 sowie 20 µl des Eluats E nach Aufreinigung der Bakterienlysate über 20 mg Protino-Säulenmaterial. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines GFP-Antikörpers. M_R: Relative Molekülmasse x 10³ und zugehörige Markerbanden (M).

4.5.3 Untersuchungen zur Lipidmodifikation

4.5.3.1 Membranproteinfractionierung

Da die Expression der acht verschiedenen, rekombinanten Fusionsproteine nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend untersucht, in welchem Zellkompartiment diese lokalisiert sind. Die Trennung der cytosolischen Proteine und der membranständigen Proteine erfolgte mittels Membranproteinfractionierung. Verwendet wurde die Methode nach

Bordier *et al.* Die Bakterienkulturen wurden wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben aufgearbeitet und Aliquots der cytosolischen Fraktionen und der Membranfraktionen wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen, auf eine Nylonmembran transferiert und die rekombinanten Proteine mittels GFP-spezifischem Antikörper detektiert. Signale der entsprechenden Größe der Fusionsproteine konnten ebenso für alle vier nicht mutierten Varianten detektiert werden. Varianten 5'ATR2:YFP-2111 und 5'ATR2mut:YFP-2111 zeigten Signale ausschließlich in den beiden Membranfraktionen. Die Membranfraktionen der Varianten 5'ATR2:YFP-2112 und 5'ATR2mut:YFP-2112 enthielten deutlich größere Mengen an Protein, sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass das detektierte Protein in der cytosolischen Fraktion durch unvollständige Trennung der Phasen entstanden ist. Die Signale nach der Aufarbeitung der Varianten 5'ATR2:YFP-2113/5'ATR2mut:YFP-2113 und 5'ATR2:YFP-2114/5'ATR2mut:YFP-2114 sind generell sehr schwach. Trotzdem konnten die zugehörigen Fusionsproteine nur in den Membranfraktionen detektiert werden (Abbildung 4.28). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Aussage treffen, dass vermutlich alle acht Varianten hauptsächlich in oder an den Membranen der Bakterien verankert sind.

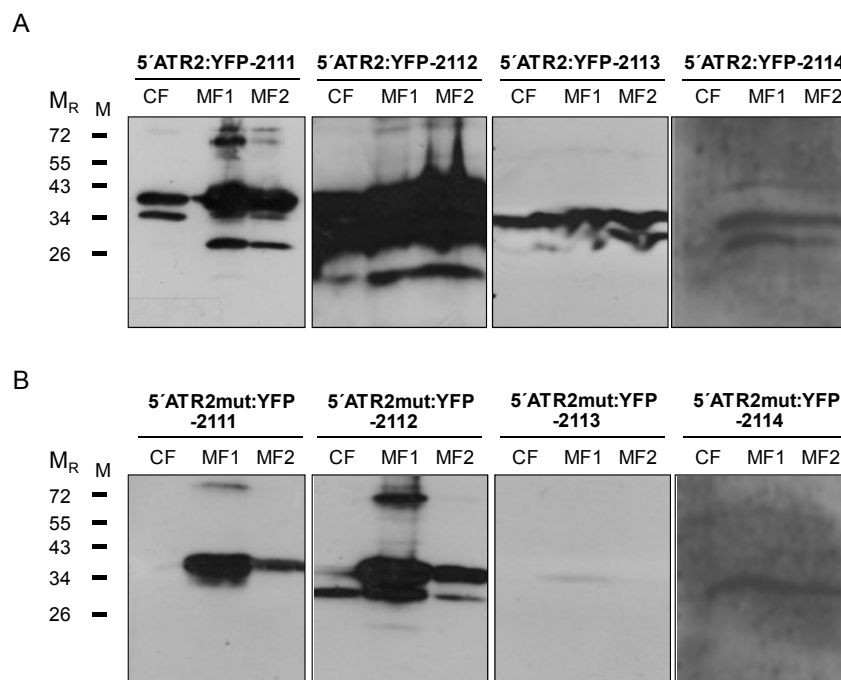


Abbildung 4.28. Immunoblot der aus Bakterien isolierten Proteinfractionen der 5'ATR2:YFP- und 5'ATR2mut:YFP-Varianten. A) Aufgetragen wurden je 20 μ l der isolierten Proteinmembranfraktionen (MF1, MF2) sowie 20 μ l eines Proteingemisches der cytosolischen Fraktion (CF) der nicht mutierten Varianten. B) Aufgetragen wurden je 20 μ l der isolierten Proteinmembranfraktionen (MF1, MF2) sowie 20 μ l eines Proteingemisches der cytosolischen Fraktion (CF) der zugehörigen mutierten Varianten. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

4.5.3.2 *In vivo*-Isotopenmarkierung

Da gezeigt werden konnte, dass die NADPH-Reduktase ATR2, in mutierter als auch nicht-mutierter Form, aller Wahrscheinlichkeit nach in oder an den bakteriellen Membranen assoziiert ist, stellte sich nun die Frage, wie bzw. durch welche Modifikation das Protein mit der Membran verankert ist. Wie bereits beschrieben, zeigt die Aminosäuresequenz von ATR2 eine typische, bakterielle Signalsequenz (LIGC), die zur Anheftung einer Fettsäure an das Protein und somit zur Verankerung in der Membran führt. Mithilfe der *in vivo*-Isotopenmarkierung sollte geklärt werden, ob dies bei Expression in den Bakterien zur Lipidierung des Proteins führt. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die Mutation der Lipobox einen Einfluss auf eine mögliche Lipidierung hat. Die acht verschiedenen Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert und bei Erreichen einer OD von 0.5 mit 10 µl der zuvor vorbereiteten [9,10-³H] Palmitinsäure versetzt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden konnten die Bakterienzellen aufgearbeitet werden. Je 20 µl der eluierten Proteine wurden anschließend auf ein Bis-Tris-Fertiggel aufgetragen. Nach Trennung der Proteine im elektrischen Feld wurde das Gel fixiert und unter Vakuum getrocknet. Ein vorbelichteter Röntgenfilm wurde aufgelegt und für 3 Wochen bei -80°C inkubiert. Parallel dazu wurden Aliquots der Bakterien vor der Zugabe von [9,10-³H] Palmitinsäure abgenommen, ebenfalls aufgearbeitet und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dies diente der Kontrolle, dass alle untersuchten Proteine auch ausreichend exprimiert wurden. Nach Entwicklung des Röntgenfilms konnten starke Signale bei den Varianten 5'ATR2:YFP-2111, 5'ATR2:YFP-2112, 5'ATR2mut:YFP-2111 und 5'ATR2mut:YFP-2112 detektiert werden. Eine in Bakterien exprimierte OspA:YFP-Fusion, die als Positiv-Kontrolle verwendet wurde, zeigte ebenfalls ein spezifisches YFP-Signal. Sehr schwache Signale zeigten die Varianten 5'ATR2:YFP-2113, 5'ATR2:YFP-2114 und 5'ATR2mut:YFP-2113. Es konnte kein Signal bei Variante 5'ATR2mut:YFP-2114 und der Negativ-Kontrolle (pSE380) detektiert werden (Abbildung 4.29A). Nach Entwicklung des radioaktiven Röntgenfilms konnten Signale ausschließlich bei Variante 5'ATR2:YFP-2111 und Variante 5'ATR2:YFP-2112 detektiert werden. In diese Fusionsproteine wurde die radioaktiv markierte Palmitinsäure eingebaut (Abbildung 4.29B). Für die zugehörigen mutierten Varianten konnten keine Signale detektiert werden. Das heißt, die Mutation der Lipobox, der Austausch des Cystein gegen ein Glycin, verhindert die Anheftung eines Lipidrestes an das Protein. Da diese Varianten aber zuvor in den bakteriellen Membranfraktionen detektiert worden waren, scheinen noch andere Mechanismen an der Verankerung beteiligt zu sein. Da die anderen 5'ATR2:YFP-Varianten in sehr geringen Mengen exprimiert wurden, lässt sich bezüglich der Isotopenmarkierung keine Aussage treffen (Abbildung 4.29B). Auch die mehrmalige Wiederholung dieses Versuchs brachte keine neuen, aussagekräftigen Resultate, da die Expression der Varianten

5'ATR2:YFP-13 und -14 sowie der entsprechenden mutierten Varianten zu keiner Zeit in größerer Menge möglich war.

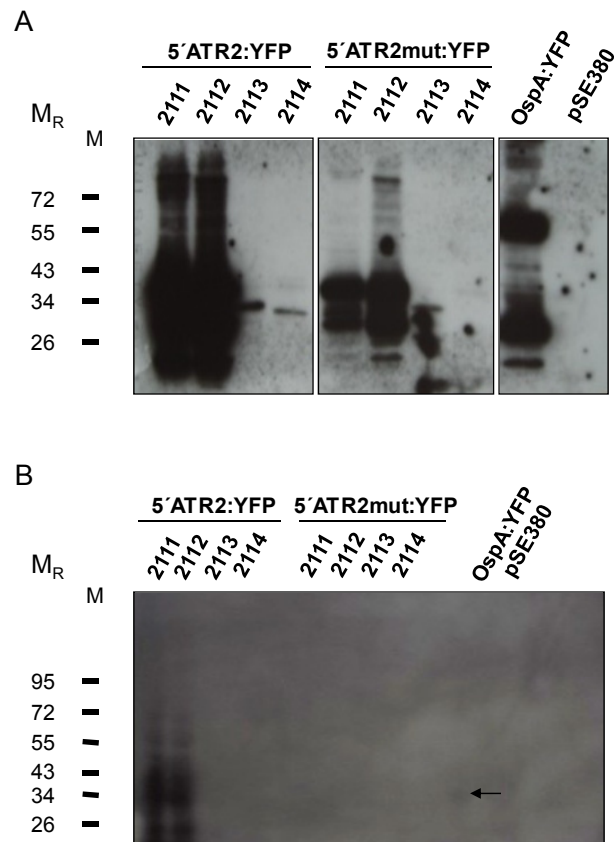


Abbildung 4.29. A) Immunoblot der in Bakterien exprimierten 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten. Aufgetragen wurden 20 µl des Eluats nach Aufarbeitung bakterieller Zellen über 20 mg des Protino-Säulenmaterials. Positiv-Kontrolle: OspA:YFP; Negativ-Kontrolle: pSE380. M_R: Relative Molekülmasse x 10³ und zugehörige Markerbanden. **B) Detektion der 5'ATR2:YFP- und 5'ATR2mut:YFP-Proteine nach *in vivo*-Isotopenmarkierung.** Es konnten radioaktive Signale für die Varianten 5'ATR2:YFP-2111 und 5'ATR2:YFP-2112 mit der relativen Molekülmasse von 40000 bzw. 38000 detektiert werden. Die Positiv-Kontrolle OspA:YFP zeigte ebenfalls ein Signal bei einer Molekülmasse von ca. 30000. M_R: Relative Molekülmasse x 10³ und zugehörige Markerbanden (M).

4.5.4 Klonierung und transiente Expression der 5`ATR2/5`ATR2mut-Varianten

Zur Untersuchung der Expression und der Lokalisation der NADPH-Reduktase ATR2 von *A. thaliana* sollten parallel zur bakteriellen Expression verschiedene Varianten des Gens in *Nicotiana benthamiana* exprimiert werden. Dazu wurde ein von der Firma ICON Genetics entwickeltes System zur transienten Expression rekombinanter Proteine in Pflanzen verwendet. Dabei werden Teile von Pflanzenviren genutzt, die als Pro-Vektor-Module fungieren und nach Einbringung in die Pflanze durch *A. tumefaciens* zum Zusammenbau eines viralen Vektors führen. Die 5'-Pro-Vektor-Module enthalten einen kurzen

Sequenzabschnitt des viralen Vektors. Dieser setzt sich aus einer Polymerase, einem Promotor, einer Rekombinationssequenz sowie einem Movement-Protein zur systemischen Verteilung der RNA zusammen. Die 3'-Pro-Vektor-Module setzen sich ebenfalls aus einem Sequenzabschnitt des viralen Vektors zusammen. Dieser enthält ebenfalls eine Rekombinationssequenz sowie eine multiple cloning site zur Klonierung des gewünschten Gens. Eine site-specific Rekombinase verknüpft im Zellkern der Pflanze die Pro-Vektor-Module zu einem funktionsfähigem Amplikon, das anschließend transkribiert, prozessiert und ins Cytosol entlassen wird. Für die Expression rekombinanter Fusionsproteine in anderen Zellkompartimenten entwickelte die Firma ICON Genetics modifizierte 5'-Module, die Signalsequenzen zum Transport der Proteine in den Chloroplast oder Apoplast besitzen. Schema 4.30 zeigt das grundlegende Prinzip der transienten Expression.

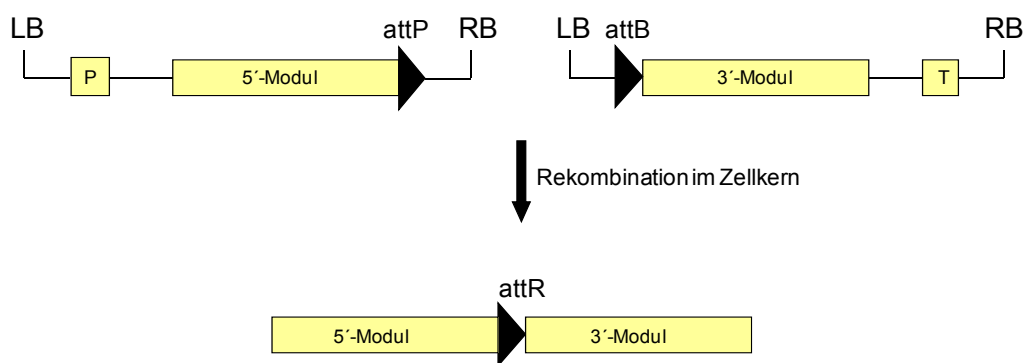


Abbildung 4.30. Schematische Darstellung der Rekombination nach Infiltration. Das 5'-Modul und das 3'-Modul werden im Zellkern mittels einer Rekombinase verknüpft und als transkribierbares Amplikon ins Cytosol entlassen. LB: Left Border, RB: Right Border, attB und attP: Rekombinationsstellen, P: Promotor, T: Terminator

Zur Klonierung standen ebenfalls die von der Firma Mr. Gene synthetisierten cDNAs der Gene 5'ATR2 und 5'ATR2mut zur Verfügung. Die Konstrukte 5'ATR2-21 und 5'ATR2mut-21 wurden direkt mittels der Restriktionsenzyme *Nco*I und *Xho*I bzw. *Sal*I aus dem Vektor geschnitten, die Restriktionsprodukte der Größe 250 bp aus dem Gel eluiert und für die anschließende Ligation in den mit *Nco*I und *Xba*I linearisierten Vektor pICH11599 verwendet. Das auch hier für alle Konstrukte benötigte Reportergen *yfp* wurde durch Verdau des bereits vorhandenen Plasmids pYFP-1433 mit den Endonucleasen *Xho*I und *Xba*I erhalten und ebenfalls für die Ligation verwendet. Nach Ligation der drei Fragmente wurde der Ansatz in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mittels Colony-Screening wurden einzelne Bakterienkolonien auf das Vorhandensein der Inserts 5'ATR2:YFP-21 und 5'ATR2mut-21 überprüft. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung

der Primer ATR2-101 und Y1.1 reverse. Positiv getestete Bakterienkolonien wurden über Nacht in entsprechendem Medium kultiviert und einer Minipräparation unterzogen. Der Restriktionsverdau der isolierten Plasmide (p5'ATR2:YFP-6321 und p5'ATR2mut:YFP-6321) mit den Enzymen *NcoI* und *XbaI* zeigte den erfolgreichen Einbau der Inserts. Die Klonierung der drei verkürzten 5'ATR2:YFP-Varianten sowie der drei verkürzten 5'ATR2mut:YFP-Varianten erfolgte analog zu der in 4.5.1 beschriebenen Klonierung für die bakterielle Expression. Im Gegensatz zur bakteriellen Expression sollte hier eine fünfte 5'ATR2-Variante (5'ATR2-21L) mit YFP fusioniert und transient exprimiert werden. Die von Mr. Gene bezogene cDNA-Sequenz 5'ATR2-11 zeigt einen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin, bedingt durch die benötigte Schnittstelle *NcoI*. Um aber einen eventuellen Einfluss der Chloroplastenlokalisationssequenz auf die Lokalisation oder den Lipidierungs-mechanismus zu untersuchen, wurde eine weitere Variante des Gens 5'ATR2 benötigt. Dazu wurde ein neuer Primer entwickelt (ATR2-101L), der statt einer *NcoI*-Schnittstelle eine *BsaI*-Schnittstelle während der Amplifikation des Templates 5'ATR2:YFP-6321 anfügt. Das daraus resultierende Fragment der Größe 1000 bp (5'ATR2-21L) konnte nun ebenfalls in den Klonierungsvektor pCRblunt ligiert werden. Die im Klonierungsvektor pCRblunt vorliegenden Gen-Varianten mussten zunächst in einen geeigneten ICON-Vektor kloniert werden, um die für die Infiltration benötigten 3'-Module zu erzeugen. Die Konstrukte p5'ATR2:YFP-1422, p5'ATR2:YFP-1423 und p5'ATR2:YFP-1424 sowie p5'ATR2mut:YFP-1422, p5'ATR2mut:YFP-1423 und p5'ATR2mut:YFP-1424 wurden dazu mittels der Restriktionsenzyme *NcoI* und *XbaI* aus dem Klonierungsvektor geschnitten, aufgereinigt, anschließend in den zuvor mit den gleichen Enzymen linearisierten ICON-Vektor pICH11599 ligiert und in TOP10 Zellen transformiert. Der Transformationserfolg wurde mittels Colony Screening unter Verwendung der genspezifischen Primer überprüft. Die Genvarianten 5'ATR2:YFP-21 und 5'ATR2mut-21 wurden wie zuvor beschrieben direkt in den ICON-Vektor pICH11599 kloniert. Die Variante 5'ATR2:YFP-21L wurde mit den Restriktionsenzymen *BsaI* und *XbaI* aus dem Klonierungsvektor geschnitten, in den ebenfalls mit *BsaI* und *XbaI* linearisierten ICON-Vektor pICH10990 ligiert und in TOP10 Zellen transformiert. Die aus positiven Bakterienklonen isolierten und durch Restriktionsverdau überprüften Plasmide, deren Nomenklatur Tabelle 4.5 zu entnehmen ist, standen nun für die Transformation von *A.tumefaciens* Zellen zur Verfügung. Die Transformation des Agrobakterienstammes GV3101 erfolgte mittels Elektroporation. Die Zellen wurden auf LB-Medium mit Rifampicin, Gentamycin und Carbenicillin ausplattiert und für drei Tage bei 28 °C kultiviert. Von positiven Bakterienklonen der neun Varianten wurden aus Flüssigkulturen Glycerolstocks gefertigt und bei -80 °C gelagert.

Für die Infiltration von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden die erzeugten 3'-Module in je 5 ml LB Rif, Gent, Carb über Nacht kultiviert. Nach Zentrifugation wurden die Pellets in 50 ml

ICON-Puffer aufgenommen, Das 5'-Modul pICH15879 wurde ebenfalls in 5 ml LB Rif, Gent, Carb und die Rekombinase pICH10880 in 5 ml LB Rif, Gent, Kan über Nacht kultiviert und in ICON-Puffer aufgenommen. Nach Mischen jedes 3'-Moduls mit Rekombinase und 5'-Modul im Verhältnis 1:1:1 wurden die Bakteriensuspensionen in die Blattunterseiten der Pflanzen infiltriert. Als Kontrolle wurde außerdem eine Pflanze mit einem für GFP kodierenden 3'-Modul infiltriert (7410).

Tabelle 4.5. Nomenklatur der 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten. Tabelle 4.5 zeigt die Nomenklatur der generierten 3'-Module zur transienten Expression. Bis auf 5'ATR2:YFP-21L wurden alle Varianten in den Vektor pICH11599 kloniert.

| Nomenklatur 3'-Module | Vektor | 5'ATR2:YFP-Variante |
|-----------------------|-----------|---------------------|
| p5'ATR2:YFP-6121L | pICH10990 | 5'ATR2:YFP-21L |
| p5'ATR2:YFP-6321 | pICH11599 | 5'ATR2:YFP-21 |
| p5'ATR2:YFP-6322 | pICH11599 | 5'ATR2:YFP-22 |
| p5'ATR2:YFP-6323 | pICH11599 | 5'ATR2:YFP-23 |
| p5'ATR2:YFP-6324 | pICH11599 | 5'ATR2:YFP-24 |
| p5'ATR2mut:YFP-6321 | pICH11599 | 5'ATR2mut:YFP-21 |
| p5'ATR2mut:YFP-6322 | pICH11599 | 5'ATR2mut:YFP-22 |
| p5'ATR2mut:YFP-6323 | pICH11599 | 5'ATR2mut:YFP-23 |
| p5'ATR2mut:YFP-6324 | pICH11599 | 5'ATR2mut:YFP-24 |

4.5.5 Identifizierung transgener Pflanzen

Die infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen wurden für 6-10 Tage unter Dauerlicht kultiviert. Da alle Genvarianten mit dem Reportergen *yfp* fusioniert waren, konnte die Expression der Fusionsproteine zunächst unter UV-Licht nachgewiesen werden. Nach etwa 6 Tagen konnte bei allen Blättern der Kontrollpflanze GFP (7410) eine deutliche Fluoreszenz der gesamten Blattfläche und somit eine Proteinakkumulation beobachtet werden. Die Pflanzen, die mit den verschiedenen 5'ATR2:YFP-Varianten und den 5'ATR2mut:YFP-Varianten infiltriert worden waren, zeigten zu keinem Zeitpunkt unter UV-Licht eine Fluoreszenz. Aus diesem Grund wurden von allen Pflanzen Blattproben entnommen und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es zeigte sich, dass alle Blattproben, mit Ausnahme der Pflanze, die mit dem Konstrukt 5'ATR2:YFP-6324 infiltriert worden war, mehrere Bereiche aufwiesen, die stark fluoreszierten und somit eine Expression der Fusionsproteine erfolgreich war. Die Proteinexpression wurde nun mittels SDS-Page und Western Blot unter

Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Eine deutliche Akkumulation von GFP zeigte die Kontrollpflanze, welche mit einem für GFP kodierenden Modul sowie dem Modul pICH15879 für die cytosolische Expression infiltriert worden war. Desweiteren konnte eine deutliche Akkumulation der rekombinanten Proteine für die Varianten 5'ATR2:YFP-6121L, -6321, -6322 und -6323, sowie für alle mutierten 5'ATR2mut:YFP-Varianten nachgewiesen werden. Die zugehörigen relativen Molekülmassen stimmten bei allen Pflanzen mit den erwarteten Molekülmassen überein und sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Die mit Konstrukt 5'ATR2:YFP-6324 infiltrierte Pflanze zeigte kein Signal, dies korreliert mit der bereits zuvor durchgeführten Betrachtung der Blattprobe unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 4.31).

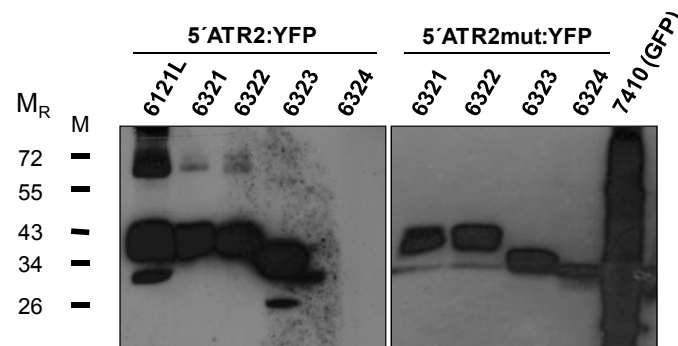


Abbildung 4.31. Immunodetektion der rekombinanten Fusionsproteine nach transienter Expression. Aufgetragen wurden je 25 μ l eines Gesamtproteinextraktes der neun Pflanzen. Die Detektion erfolgte mit einem GFP-spezifischen Antikörper. Als Positiv-Kontrolle wurden 20 μ l Proteinextrakt einer Pflanze aufgetragen, die mit einem für GFP kodierenden Modul infiltriert worden war. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

Tabelle 4.6. Name der Genvarianten mit der zu erwartenden relativen Molekülmasse (M_R).

| Genvariante | Rel. Molekülmasse (M_R) |
|----------------------------------|-----------------------------|
| p5'ATR2:YFP-21L | $\sim 40 \times 10^3$ |
| p5'ATR2:YFP-21/p5'ATR2mut:YFP-21 | $\sim 40 \times 10^3$ |
| p5'ATR2:YFP-22/p5'ATR2mut:YFP-22 | $\sim 38 \times 10^3$ |
| p5'ATR2:YFP-23/p5'ATR2mut:YFP-23 | $\sim 35 \times 10^3$ |
| p5'ATR2:YFP-24/p5'ATR2mut:YFP-24 | $\sim 33 \times 10^3$ |

Auch nach mehrmaliger Infiltration sowie nach Abänderung verschiedener Parameter wie zum Beispiel Verwendung von Agrobakteriensuspensionen mit höherer oder geringerer

Zelldichte war es nicht gelungen, das Fusionsprotein 5`ATR2:YFP-6324 transient zu exprimieren. Trotzdem kann die Methode der transienten Expression für weiterführende Experimente genutzt werden, da im Gegensatz zur langwierigen Erzeugung transgener Pflanzen mittels Transformation des Chloroplasten- oder Kerngenoms in diesem Fall eine schnelle Proteinproduktion möglich ist.

4.5.6 Untersuchungen zur Lokalisation der 5`ATR2/5`ATR2mut-Varianten

4.5.6.1 Isolierung intakter Chloroplasten

Da die transiente Expression der verschiedenen Fusionsproteine mit Ausnahme von Variante 5`ATR2:YFP-6324 erfolgreich war, konnte im Folgenden die Lokalisation dieser in Abhängigkeit der unterschiedlich langen Chloroplastenlokalisationssequenz untersucht werden. Dazu wurden alle Varianten erneut transient in *Nicotiana benthamiana* Pflanzen exprimiert. Nach Überprüfung der Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten anschließend aus je 40 g Blattmaterial Chloroplasten isoliert werden. Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, sammelten sich die intakten Chloroplasten an der Interphase des Percoll-Gradienten, wurden vorsichtig abgenommen und in ca. 2 ml Waschpuffer aufgenommen. Zusätzlich wurden Aliquote der Fraktionen entnommen, die zerstörte Chloroplasten beziehungsweise andere Zellbestandteile enthielten. Für eine anschließende SDS-Page wurden jeweils 20 µl der im Waschpuffer vorliegenden Chloroplasten mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C erhitzt. Nach erfolgter SDS-Page und Transfer auf eine Nylonmembran wurden die rekombinanten Proteine unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers detektiert. Für die 5`ATR2:YFP-Varianten 6121L, 6321, 6322 und 6323 konnten Signale sowohl in den intakten als auch in den zerstörten Chloroplastenfraktionen detektiert werden. Für Variante 5`ATR2:YFP-6121L, welche die vollständige Chloroplastensignalsequenz enthält, konnte ein starkes Signal hauptsächlich in der intakten Chloroplastenfraktion detektiert werden, das lässt vermuten, dass dieses Protein tatsächlich in die Chloroplasten transportiert wird. Es konnte ebenfalls ein stärkeres Signal der intakten Chloroplastenfraktion für Variante 5`ATR2:YFP-6321 und 5`ATR2:YFP-6322 detektiert werden. Somit würde das Protein trotz verkürzter Signalsequenz in die Chloroplasten transportiert werden. Da das Signal für Variante 5`ATR2:YFP-6323 in der zerstörten, Zelltrümmer enthaltenden Fraktion deutlich stärker ist, könnte es sein, dass dieses Protein nicht in die Chloroplasten transportiert wird, was durch das Fehlen der Lokalisationssequenz zu erklären wäre.

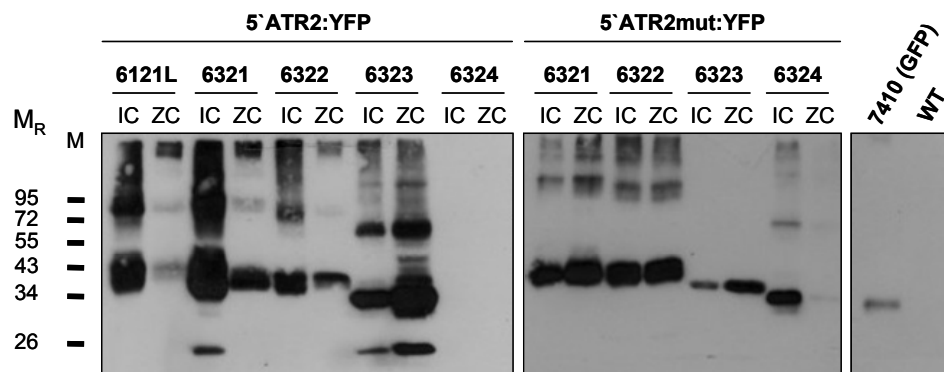


Abbildung 4.32. Immunoblot isolierter Chloroplasten nach transienter Expression. *N. benthamiana* Pflanzen wurden mit den verschiedenen Genvarianten infiltriert und die Chloroplasten nach 8 Tagen isoliert. Aufgetragen wurden jeweils 20 µl der intakten Chloroplastenfraction (IC) sowie je 20 µl der zerstörten Chloroplastenfraction (ZC). Als Positiv-Kontrolle dienten intakte Chloroplasten einer GFP-Pflanze (7410). Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

Die Signale für die jeweiligen Fraktionen der Varianten 5'ATR2mut:YFP-6321, 5'ATR2mut:YFP-6322 und 5'ATR2mut:YFP-6323 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Intensität kaum, sodass in diesem Fall zur Lokalisation der Proteine keine Aussage getroffen werden kann. Für Variante 5'ATR2mut:YFP-6324 konnte hauptsächlich ein Signal für die intakte Chloroplastenfraction detektiert werden (Abbildung 4.32). Das widerspricht allerdings dem Ergebnis der zugehörigen nicht mutierten Variante, da auch das Protein 5'ATR2mut:YFP-6324 durch das Fehlen der Lokalisationssequenz und durch die Mutation gekennzeichnet ist. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Methode der Chloroplastenisolierung wahrscheinlich doch nicht ausreichend zuverlässig ist und die Trennung in intakte Chloroplasten und andere Zellreste nicht ausreichend genau ist.

4.5.6.2 Isolierung von Protoplasten

Wie zuvor beschrieben, konnte die Lokalisation der Fusionsproteine mittels der Methode der Chloroplastenisolierung nicht eindeutig bestimmt werden. Da alle 5'ATR2- und 5'ATR2mut-Varianten mit dem Reportergen *yfp* fusioniert waren, konnte die Lokalisation der exprimierten Fusionsproteine visuell durch die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie bestimmt werden. Dazu wurden zunächst wieder alle neun Varianten zusammen mit dem Modul für cytosolisches Targeting und der Rekombinase in *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Nach 7 Tagen wurden Blattproben jeder Pflanze entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Auch in diesem Fall konnten wieder für alle Varianten außer für 5'ATR2:YFP-

6324 größere Bereiche detektiert werden, die stark fluoreszierten und somit die Fusionsproteine exprimierten. Nun wurden aus jeder der verschiedenen Pflanzen stoffwechselaktive Protoplasten isoliert und in MSTM-Puffer aufgenommen. Trotz des visuellen Nachweises wurden zum Bestätigen der Proteinexpression Aliquote jeder Variante auf eine SDS-PAGE aufgetragen und die Proteine unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers detektiert (Abbildung 4.33).

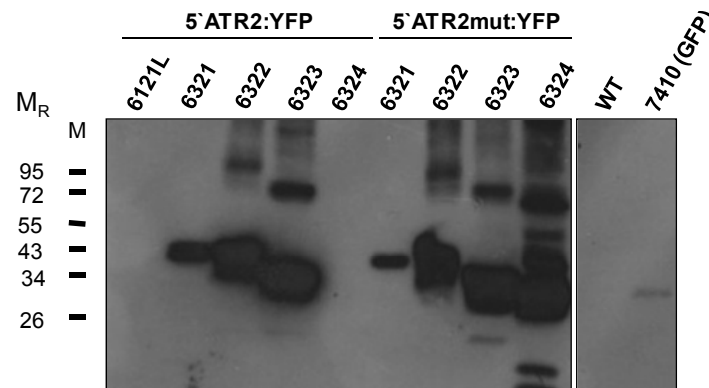


Abbildung 4.33. Immunoblot der isolierten Protoplasten nach transienter Expression. Aufgetragen wurden je 20 μ l der in MSTM-Puffer resuspendierten Protoplasten jeder Pflanzenlinie. Die Detektion erfolgte mit einem GFP-spezifischen Antikörper. M_R : Relative Molekülmasse $\times 10^3$ und zugehörige Markerbanden (M).

Wie erwartet zeigten die Protoplasten der Variante 5'ATR2:YFP-6324 kein Signal der entsprechenden Molekülmasse von 33000. Auch für die Protoplasten der Variante 5'ATR2:YFP-6121L konnte kein Signal detektiert werden, obwohl einzelne Bereiche deutlich fluoreszierten (Abbildung 4.33). Da aber unter dem Mikroskop nur ein sehr geringer Ausschnitt des Blattes betrachtet wurde, ist es möglich, dass der Rest des Blattes aus welchem die Isolierung der Protoplasten erfolgte, keine weitere Fluoreszenz aufwies. Es könnte allerdings auch ein Hinweis darauf sein, dass dieses Protein in den Apoplasten transportiert wird und dementsprechend in den Protoplasten nicht mehr zu detektieren ist. Für die Protoplasten aller anderen Varianten konnten erneut entsprechende Signale der relativen Molekülmasse von 33000 bis 40000 detektiert werden. Die in MSTM-Puffer resuspendierten Protoplasten konnten nun für die Mikroskopie verwendet werden.

4.5.6.3 Mikroskopische Bildgebung mittels CLSM

Zur visuellen Lokalisation der 5'ATR2:YFP- und 5'ATR2mut:YFP-Proteine wurden die in MSTM-Puffer resuspendierten, Protoplasten verwendet. Die Detektion der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte bei 640 nm (Rot-Kanal), die Detektion von YFP erfolgte bei 520 nm (Grünkanal). Abbildung 4.34 zeigt die Lokalisation der nicht mutierten 5'ATR2:YFP-Varianten. Für das Volllänge-Protein 5'ATR2:YFP-6121L, welches die komplette N-terminale Signalsequenz aufweist, konnte deutlich gezeigt werden, dass es nicht in den Chloroplasten geleitet wird. Somit wäre gezeigt, dass die N-terminale Signalsequenz keine Chloroplastenlokalisationssequenz darstellt. Aufgrund der CLSM-Aufnahmen kann aber eine eindeutige membranassoziierte Lokalisation festgestellt werden. Das Protein könnte entweder in der Cytoplasmamembran, am ER oder sogar in oder an der äußeren Chloroplastenmembran verankert sein. Die kürzeren Proteinvarianten 5'ATR2:YFP-6321, -6322 und -6323, die unvollständige oder keine putative Chloroplastenlokalisationssequenzen aufweisen, sind ebenfalls, wie erwartet, nicht in den Chloroplasten lokalisiert. Die zu erkennenden netzförmigen Strukturen lassen auf eine Verankerung in der ER-Membran schließen. An manchen Stellen zeigt sich eine sehr starke Akkumulation der Proteine, die entweder durch die Überlagerung verschiedener Ebenen verursacht wird, oder durch eine Ansammlung der Proteine innerhalb von Endosomen. Als Vergleich dienten Protoplasten einer GFP-Pflanze (7410), die mit dem Modul für Chloroplastentargeting infiltriert worden war (7410 + 20030). Bei Überlagerung der beiden Kanäle bzw. deren Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass das GFP deutlich in den Chloroplasten akkumuliert vorliegt. Für Variante 5'ATR2:YFP-6324 konnten wie erwartet keine fluoreszierenden Protoplasten detektiert werden.

Abbildung 4.35 zeigt die Expression und Lokalisation der mutierten 5'ATR2mut:YFP-Varianten. Eindeutig zu erkennen ist, dass das Protein 5'ATR2mut:YFP-6321 trotz vollständiger N-terminaler Sequenz, bis auf einen Aminosäureaustausch, ebenfalls nicht in den Chloroplasten lokalisiert ist. Die vermutlich hohlen, netzförmigen Strukturen lassen auf eine Verankerung in oder an der ER-Membran schließen. Auch die Ansammlungen des Proteins am Rand der Protoplasten scheinen auf eine Akkumulation in oder an der Cytoplasmamembran hinzudeuten. Die Varianten 5'ATR2mut:YFP-6322, -6323 und -6324, mit kürzerer oder fehlender Signalsequenz, zeigen alle etwa die gleiche Verteilung des Proteins innerhalb der Protoplasten. Deren genaue Lokalisation kann an dieser Stelle nur vermutet werden, die kugelförmige Ansammlung der Proteine an manchen Stellen lässt auch in diesem Fall auf eine Akkumulation in Endosomen, die röhrenförmigen Strukturen auf eine Verankerung in der ER-Membran schließen.

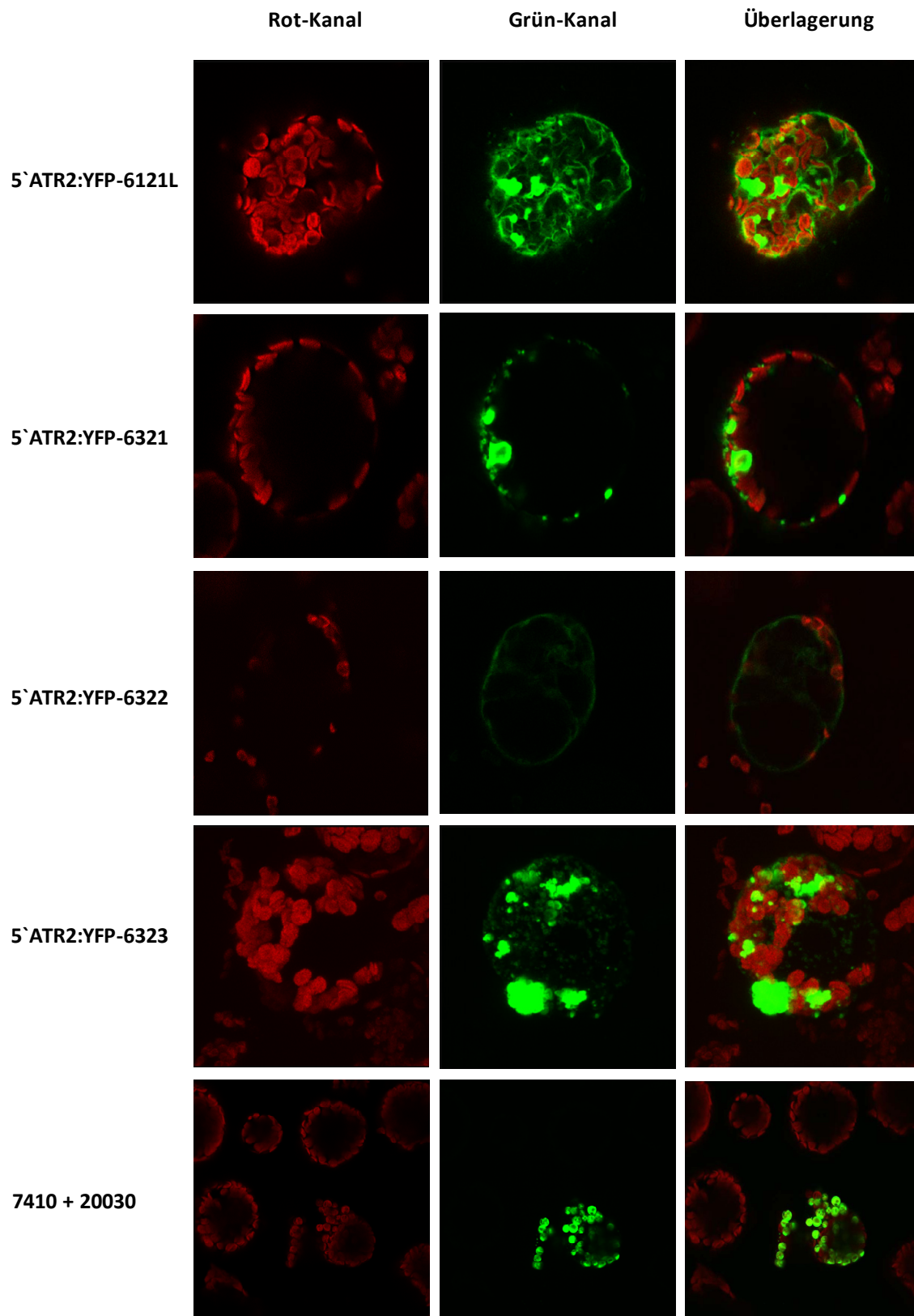


Abbildung 4.34. Untersuchungen zur Lokalisation der 5`ATR2:YFP-Varianten unter Verwendung des CLSM. Die Abbildung zeigt Aufnahmen isolierter Protoplasten. Alle Konstrukte wurden mit dem Modul 15879 (cytosolisches Targeting) infiltriert. Als Kontrolle dienten Protoplasten einer GFP-Pflanze, die mit dem Modul für Chloroplastentargeting infiltriert worden war (7410 + 20030). Links: Detektion der Chlorophyllfluoreszenz. Mitte: Detektion der YFP-Fusionsproteine. Rechts: Überlagerung beider Aufnahmen.

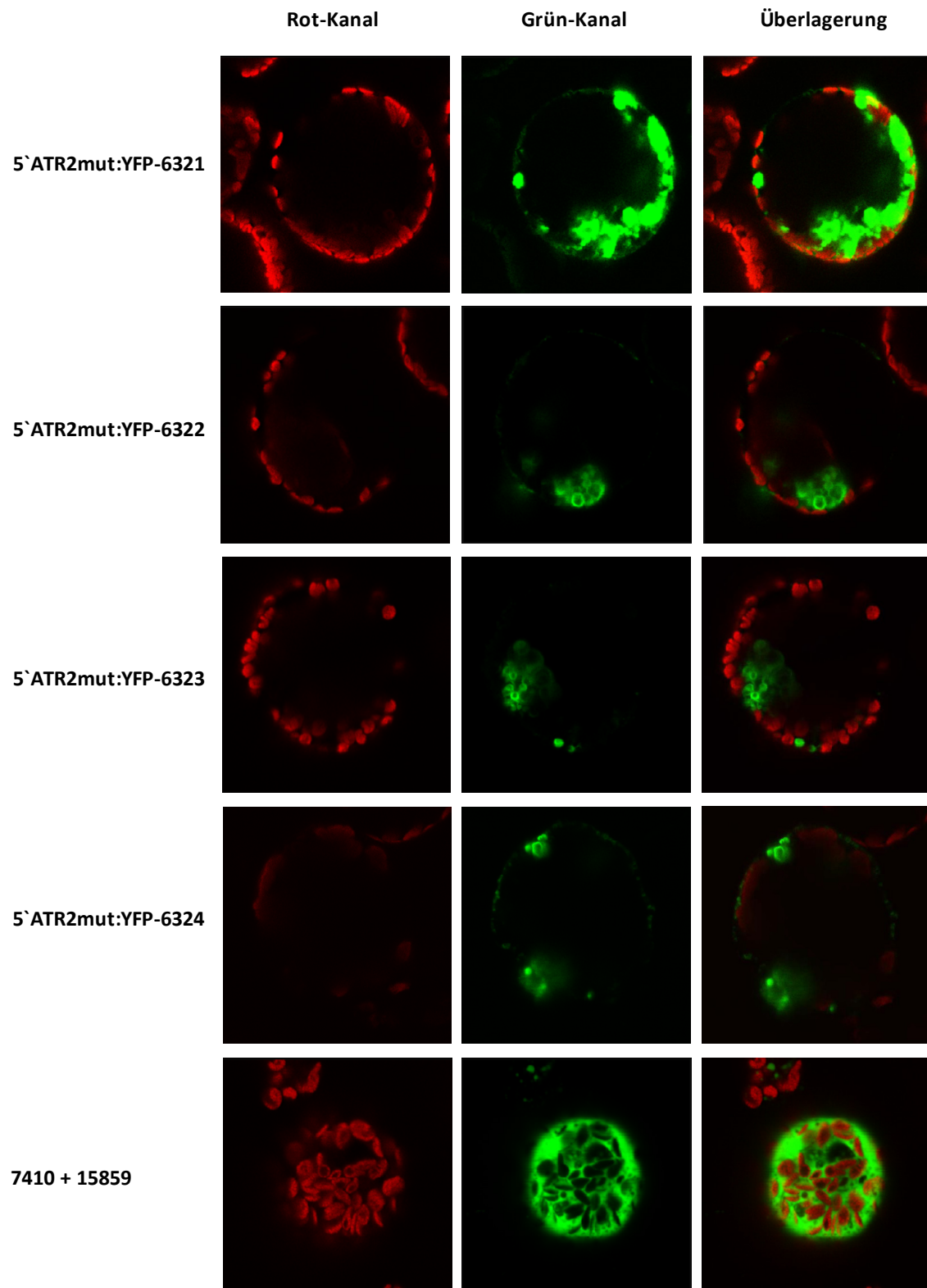


Abbildung 4.35. Untersuchungen zur Lokalisation der 5`ATR2mut:YFP-Varianten unter Verwendung des CLSM. Die Abbildung zeigt Aufnahmen isolierter Protoplasten. Alle Konstrukte wurden mit dem Modul 15879 (cytosolisches Targeting) infiltriert. Als Kontrolle dienten Protoplasten einer GFP-Pflanze, die mit dem Modul für cytosolisches Targeting infiltriert worden war (7410 + 15879). Links: Detektion der Chlorophyllfluoreszenz. Mitte: Detektion der YFP-Fusionsproteine. Rechts: Überlagerung beider Aufnahmen.

Als direkter Vergleich dienten Protoplasten einer GFP-Pflanze, die mit dem Modul 15879 für cytosolische Akkumulation infiltriert worden war. Es konnte eine deutliche Fluoreszenz innerhalb des gesamten Cytosols detektiert werden. Zudem kann daraus geschlossen werden, dass trotz der Mutation der Lipobox eine Verankerung in Membranen stattfindet.

4.5.7 Untersuchungen zur Lipidmodifikation der 5`ATR2/5`ATR2mut -Varianten

4.5.7.1 *In vivo*-Isotopenmarkierung

Die Lipidierung von Proteinen, zum Beispiel der Einbau von Palmitinsäure, ist eine von vielen Modifikationen, die in der Pflanze stattfinden können. Über die NADPH-Reduktase ATR2 von *A. thaliana* ist dabei aber sehr wenig bekannt. Da dieses Protein ein Co-Enzym der membranständigen Cytochrom-P450-Enzyme ist, besteht die Möglichkeit, dass auch dieses Protein lipidiert, und anschließend in die Membran der Pflanze integriert wird. Auch das Vorhandensein der Lipoboxsequenz LIGC, welche als bakterielles Lipidierungssignal bekannt ist, lässt auf eine mögliche Lipidierung schließen, da bereits gezeigt werden konnte, dass derartige Sequenzen in Pflanzen als Lipidierungssignal erkannt werden (Glenz *et al.*, 2006).

Mithilfe einer *in vivo*-Isotopenmarkierung sollte untersucht werden, ob eine Lipidierung, in dem Fall der Einbau von radioaktiv markierter Palmitinsäure, erfolgt. Dazu wurden 200 µl zuvor isolierter Protoplasten der 5`ATR2- und 5`ATR2mut-Varianten mit je 200 µCi [9,10-³H] Palmitinsäure versetzt und für drei Stunden unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden wie aufgearbeitet und auf ein Bis-Tris-Fertiggel aufgetragen. Nach Trocknung des Gels wurde ein vorbelichteter Röntgenfilm aufgelegt und bei -80°C gelagert. Nach etwa drei Wochen sollte der erfolgreiche Einbau der radioaktiv markierten Palmitinsäure anhand von spezifischen Signalen zu erkennen sein. In Abbildung 4.36 ist das Ergebnis der Isotopenmarkierung nach Entwicklung des Röntgenfilms zu sehen. Es zeigte sich, dass zwar verschiedene Signale detektiert werden konnten, aber eine genaue Aussage trotzdem nicht getroffen werden kann. Die schwachen und diffusen Signale traten bei allen neun getesteten Varianten auf, im Vergleich dazu zeigte der Wildtyp keine Signale. Auch die Höhe der Signale korreliert mit den errechneten Molekülmassen, trotzdem könnte es sich bei diesen Ergebnissen um eine unspezifische Bindung der Palmitinsäure handeln. Auch die zweimalige Wiederholung des Versuchs führte zu keinen aussagekräftigeren Ergebnissen. Demnach kann daraus geschlossen werden, dass eine Lipidierung von ATR2 in Pflanzen nicht stattfindet und die nachgewiesene Verankerung in den Membranen durch andere Mechanismen erfolgen muss.

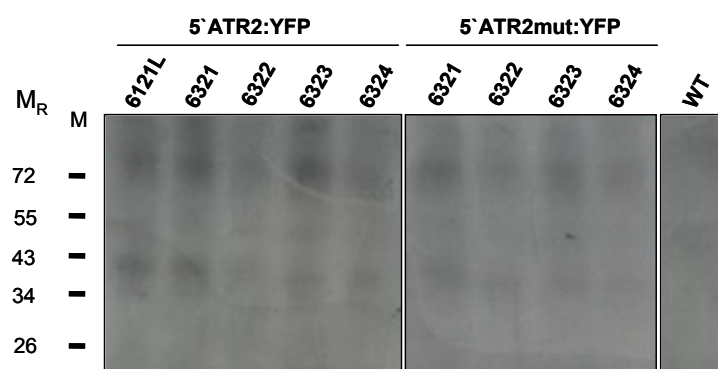


Abbildung 4.36. Ergebnis der *in vivo*-Isotopenmarkierung. Es konnten bei allen Varianten schwache, diffuse Signale der relativen Molekülmassen von 33000– 40000 detektiert werden. Da diese Signale allerdings auch durch eine unspezifische Bindung der Palmitinsäure entstanden sein könnten, lässt sich keine genaue Aussage bezüglich der Lipidierung treffen. M_R: Relative Molekülmasse x 10³ und zugehörige Markerbanden (M).

5. Diskussion

Seit etwa 20 Jahren werden Pflanzen zur Produktion rekombinanter Proteine genutzt. Entweder, um noch relativ unbekannte Proteine zu identifizieren oder näher zu charakterisieren, oder um die Pflanzen direkt als Produktionssystem zur Herstellung therapeutischer Proteine zu nutzen (Austin *et al.*, 1994). Eukaryotische Cytochrom P450 Enzyme, die aufgrund ihrer vielseitigen Biotransformationsreaktionen generell heute Gegenstand von vielen Forschungsprojekten sind, sind vor allem auch interessante Werkzeuge bezüglich eines gezielten Metabolic Engineering in Pflanzen. Zum Beispiel stellt die Erzeugung von neuen Farbvarianten mittels transgener Pflanzen ein beeindruckendes Beispiel einer solchen gezielten Veränderung des Metabolismus durch Cytochrome dar ((Holton *et al.*, 1993; Nakatsuka *et al.*, 2007).

Die Expression des humanen Cytochrom-P450-Enzyms CYP2A6 in aktiver Form konnte bereits in Bakterien als auch in Pflanzen erfolgreich gezeigt werden (Gillam *et al.*, 1996; Warzecha *et al.*, 2007). Da die Expression des funktionsfähigen CYP2A6, das letztendlich in der Lage war, Indoxyl aus Indol zu bilden, im Kerngenom von *Nicotiana tabacum* Pflanzen zwar möglich, die Menge an gebildetem Protein jedoch eher gering war, sollte nun das Chloroplastengenom der Tabakpflanzen als Expressionsort genutzt werden. Da die Synthese von Tryptophan als auch die zwischenzeitliche Bildung des Stoffwechselintermediats Indol in den Chloroplasten stattfindet, sollte hier evaluiert werden, ob eine Bildung von indigoiden Pigmenten möglich ist. Außerdem sollte die Expression in den Chloroplasten durch die zielgerichtete Integration des Transgens zu einer deutlich höheren Proteinausbeute führen (Verma *et al.*, 2008).

5.1 Charakterisierung homoplastischer CYP2A6-Linien

Zur Charakterisierung des humanen CYP2A6 standen initial verschiedene Pflanzenlinien beziehungsweise Samen zur Verfügung, deren Chloroplastengenom mit unterschiedlichen Vektoren sowie auch unterschiedlichen CYP2A6-Gensequenzen transformiert worden war. Transgene pNT2-2A6-Pflanzenlinien, die für eine Charakterisierung zur Verfügung standen, enthielten das native 2A6-Gen, welches bereits für die Kerntransformation verwendet worden war, im Vektor pNT2. Der durch die Klonierung bedingte Aminosäureaustausch von Lysin zu Alanin könnte hierbei von Vorteil sein, da gezeigt werden konnte, dass ein Aminosäureaustausch innerhalb der ersten sieben Aminosäuren zu einer gesteigerten Expression führen kann (Barnes *et al.*, 1991; Tabelle 5.1). Desweiteren steht hier die Transkription des Gens unter Kontrolle des lichtabhängigen Promotors *psbA* und die

Integration in das Chloroplastengenom erfolgte zwischen die plastidären Gene *accD* und *rbcL*. Zusätzlich wurden Pflanzen charakterisiert, die neben der cDNA des *CYP2A6* auch die cDNA der humanen NADPH-Reduktase *hNPR* im Vektor pNT2 enthielten.

Desweiteren standen Pflanzenlinien zur Verfügung, die eine mutierte Variante des *CYP2A6*-Gens im Vektor pRB95, ein modifizierter Abkömmling des pUC119 Plasmids, enthielten (p2A6-4441). Diese Sequenz war durch die Einführung zweier Punktmutationen an Position 240 und 297 gekennzeichnet. Dies sollte zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivität, und somit zu einer erhöhten Indican- oder Indigobildung führen (Tabelle 5.1). Auch in diesem Fall wird die Transkription von *CYP2A6* durch den lichtabhängigen Promotor *psbA* geregelt. Im Unterschied zu den pNT2-Linien erfolgte die Integration des Gens in das Plastidengenom an einer anderen Stelle, da in manchen Fällen beobachtet werden konnte, dass eine Variation in der Integrationsseite zu einer veränderten Expressionsrate führen kann (Hennig *et al.*, 2007).

Tabelle 5.1. Nomenklatur der Vektoren und Sequenzen der verwendeten *cyp2A6*-cDNAs.

| Transgene Linie | Expressionsvektor | CYP2A6-Sequenz |
|-----------------|-------------------|--|
| pNT2-2A6 | pNT2 | MAASGMILLV...QL L Q...TL N LF...FLPR* |
| pNT2-2A6-hNPR | pNT2 | MAASGMILLV...QL L Q...TL N LF...FLPR* |
| p2A6-4441 | pRB95 | MAASGMILLV...QL C Q...TL Q LF...FLPRHHHHH* |

DNA-Untersuchungen zeigten, dass alle getesteten Pflanzen der Linien pNT2-2A6, p2A6-4441 und pNT2-2A6-hNPR das Transgen *CYP2A6* enthielten. Linie pNT2-2A6-hNPR wurde zusätzlich auf das Vorhandensein des Gens *hNPR* getestet, auch dieses konnte für jede Pflanze nachgewiesen werden. Auch die Genexpression auf Transkriptebeine wurde erfolgreich bestätigt. Für Pflanzen der Linien pNT2-2A6 und p2A6-4441 konnte für alle Individuen die spezifische 2A6-mRNA nachgewiesen werden. Die spezifische RNA in Linie pNT2-2A6-hNPR konnte nur für drei Pflanzen detektiert werden, was in diesem Fall allerdings keine Rolle spielt, da durch die gezielte Transformation des Chloroplastengenoms alle erzeugten Pflanzen genetisch identisch sind (Bock, 2001). Somit wäre es im Grunde ausreichend, jeweils eine Pflanze pro Linie zu charakterisieren. Hier reichte es ebenfalls aus, nur die *CYP2A6*-Sonde zur Detektion der mRNA zu verwenden, da beide Gene innerhalb eines bicistronischen Plasmids liegen und somit nur eine mRNA entstehen kann. Im Allgemeinen lässt sich für alle Pflanzenlinien sagen, dass die Transkription des Gens *CYP2A6* generell nachgewiesen werden konnte. Trotzdem scheint nur eine geringe Menge

an RNA gebildet zu werden, da die erhaltenen Signale schwach waren und eher der Transkriptmenge nach Expression im Kerngenom entsprachen. Zur Detektion des Proteins CYP2A6 wurde ein CYP2A6-spezifischer Antikörper verwendet. Pflanzen der Linie pNT2-2A6-hNPR wurden zusätzlich unter Verwendung eines Reduktase-spezifischen Antikörpers auf Bildung des Proteins hNPR untersucht, da es trotz der Bildung einer mRNA, zur Synthese von zwei Proteinen kommen sollte. Es zeigte sich, dass die Proteinakkumulation von CYP2A6 weder mit dem Reduktase-spezifischen Antikörper noch mit dem 2A6-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte. Auch die Wiederholung der Versuche an verschiedenen alten Pflanzen führte zu keiner Zeit zu einem positiven Ergebnis, sodass davon ausgegangen werden muss, dass eine stabile Expression in diesen transgenen Linien nicht gegeben ist. Für Pflanzen der Linien pNT2-2A6 und p2A6-4441 konnte die erfolgreiche Synthese des CYP2A6 nachgewiesen werden. Doch auch hier zeigte sich ein eher schwaches Signal auf dem Röntgenfilm, was letztendlich mit der geringen Menge an RNA korreliert. Da die Synthese des Proteins erfolgreich nachgewiesen werden konnte, konnten die Pflanzen nun bezüglich Funktionalität beziehungsweise Aktivität getestet werden. Sollte das gebildete Protein tatsächlich aktiv sein, müssten die Pflanzen in der Lage sein, Indoxyl aus Indol zu bilden und dieses zu speichern. Im Idealfall sollte eine direkte Bildung von Indigo ermöglicht werden, da in den Chloroplasten vermutlich keine Glycosyltransferasen vorkommen und somit eine schnelle Glycosylierung des Stoffwechselintermediats Indoxyl vermieden werden sollte. Den Pflanzen wurde Indol zugegeben und diese für ein bis zwei Tage kultiviert. Eine längere Inkubationszeit konnte nicht eingehalten werden, da die Pflanzen bereits nach etwa einem Tag zu welken begannen. Zuerst färbte sich das Medium rot, was wahrscheinlich auf eine Wechselwirkung des zugegebenen Indols mit Nährstoffkomponenten des Mediums zurückzuführen war. Etwa sechs bis acht Stunden nach Verfärbung des Mediums welkten die Pflanzen und mussten geerntet werden. Die durchgeführte Dünnschichtchromatographie zeigte, dass Pflanzen der Linien pNT2-2A6 und p2A6-4441 eindeutig in der Lage waren, Indol zu Indoxyl zu hydroxylieren. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass das Protein CYP2A6 definitiv fähig ist, mit einer Tabakspezifischen NADPH-Reduktase zu kooperieren und somit als aktives Protein in den Chloroplasten exprimiert werden kann. Hier stellt sich nun zunächst die Frage, durch welches Enzym das entstandene Indoxyl zu Indican metabolisiert wird. Da vermutet wird, dass in den Chloroplasten keine Glycosyltransferasen existieren, muss ein anderes unbekanntes Enzym die Übertragung des Zuckerrestes auf Indoxyl katalysieren. Andererseits ist es so, dass über die Familie der Glycosyltransferasen in höheren Pflanzen trotz intensiver Forschung bisher wenig bekannt ist, einige wenige wurden bis heute genau charakterisiert. Auch über die Regulation pflanzlicher Glycosyltransferase-Gene und der zugehörigen Proteine bezüglich ihrer Lokalisation auf zellulärer Ebene ist wenig erforscht

(Gachon *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2001). Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Metabolisierung von Indoxyl zu Indican innerhalb der Chloroplasten durch diese Enzyme oder zumindest Glycosyltransferase-ähnliche Enzyme katalysiert wird.

Die Aktivität des Proteins CYP2A6 konnte eindeutig nachgewiesen werden. Doch zeigte sich, dass die Akkumulation von Indican gemessen an der Intensität der Indican-Zone nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung sehr schwach war. Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich auf die Tatsache zurückführen, dass von vornherein wenig RNA und somit wenig aktives Protein in der Pflanze vorlag. Aufgrund dessen wurden die Pflanzen der Linien pNT2-2A6 und p2A6-4441 bis zum Erreichen eines Alters von etwa sechs bis sieben Wochen kultiviert, um die Möglichkeit einer vermehrten Proteinsynthese zu gewährleisten. Überraschenderweise konnte bei älteren Pflanzen kein Protein mehr detektiert werden. Auch für Pflanzen, die parallel zur sterilen Kultivierung auf Erde herangezogen wurden, konnte zu keiner Zeit das Protein CYP2A6 detektiert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob dies auf eine falsche Faltung und dadurch auf einen sehr schnellen Proteinabbau in den jungen Pflanzen zurückzuführen ist, oder ob bereits auf RNA-Ebene ein Abbau des Transkripts auftritt. Zur Untersuchung der zweiten möglichen Ursache wurden erneut Samen der Linien auf sterilem Medium ausgebracht und kultiviert. Die Transkription sollte nun in Abhängigkeit des Pflanzenalters, also zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet werden. Blattmaterial zweier Pflanzen der Linie pNT2-2A6 wurde jeweils 5, 10, 13 und 16 Wochen nach Aussaat geerntet, für zwei Pflanzen der Linie p2A6-4441 erfolgte die Ernte des Blattmaterials 5, 9, 11 und 14 Wochen nach Aussaat. Es zeigten sich für beide Linien ähnliche beziehungsweise die gleichen Ergebnisse. Es konnte eine deutliche Abnahme der Intensität des spezifischen mRNA-Signals beobachtet werden. Nach 10-12 Wochen konnte ein sehr schwaches oder kein Signal mehr detektiert werden. Blattmaterial, das nach 14 beziehungsweise 16 Wochen geerntet worden war, zeigt wieder ein etwas stärkeres Signal. Das erscheint zunächst ungewöhnlich, könnte sich allerdings durch ein Aufbrauchen der Nährstoffe im Medium erklären. Denn nach 14-16 Wochen mussten die Pflanzen aufgrund des schnellen Wachstums in größere Kultivierungsgefäße umgesetzt werden. Somit standen diesen wieder frische Nährstoffe zur Verfügung. Je länger die Pflanzen sich im entsprechenden Medium befinden, umso mehr Nährstoffe werden verbraucht, sodass die RNA-Synthese vermutlich nach längerer Zeit durch den Mangel an Nährstoffen eingestellt wird und demzufolge auch kein Protein mehr synthetisiert werden kann. Werden die Pflanzen auf neues Medium gebracht, beginnt die Pflanze erneut mit der Synthese von RNA. Dies könnte generell ein Grund für die Bildung von sehr geringen Mengen Protein sein, allerdings zeigen auf Erde kultivierte Pflanzen ähnliche Ergebnisse. Desweiteren unterschieden sich bereits die RNA-Gesamtlevel der verschiedenen alten Pflanzen sehr stark und der Mangel an Nährstoffen im sterilen Medium ist demnach nur eine Vermutung und kann auch nicht der einzige Grund für

die fehlende Proteinsynthese sein. Wahrscheinlicher ist, dass die gebildete mRNA durch verschiedene Mechanismen frühzeitig abgebaut wird. Die Tatsache, dass die mRNA-Level der transgenen CYP2A6-Linien so extrem gering sind und die RNA scheinbar auch sehr schnell abgebaut wird, kann viele verschiedene Ursachen haben. Generell können die Transkriptionslevel sehr stark variieren, die Transkriptionsraten einiger Gene können im Vergleich zu anderen Genen um bis zu 300-fach erhöht sein (Kapoor *et al.*, 1997). Die Gründe hierfür können unter anderem in der Topologie der plastidären DNA, der DNA-Methylierung und -Phosphorylierung als auch in der Nutzung der verschiedenen Promotoren durch verschiedene RNA-Polymerasen liegen (Kapoor *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1990). Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass der lichtabhängige Promotor *psbA* nicht aktiv genug ist und deshalb nur geringe Mengen an RNA synthetisiert werden.

Eine weitaus größere Rolle, im Hinblick auf die Akkumulation größerer Mengen Protein, spielt die Stabilität der in den Chloroplasten gebildeten mRNA. Dabei ist die mRNA Stabilität sowohl von der 5'- als auch von der 3'- untranslatierten Region abhängig (Monde *et al.*, 2000). Die 5'UTR ist vor allem für die mRNA Maturation als auch für die Translationskontrolle wichtig (Sugita und Sugiura, 1996). Dieser Bereich setzt sich zum Beispiel aus Sequenzelementen zusammen, die als Bindestelle für genspezifische Translationsaktivatoren fungieren, so mit den Ribosomen interagieren und die Translation einleiten (Higgs *et al.*, 1999). Die 3'UTR ist in erster Linie für die Stabilisierung der mRNA zuständig. Ein charakteristisches Merkmal dieser 3'UTR's sind inverted repeats, die typische hairpin-loops bilden, und sowohl in Bakterien als auch in Chloroplasten vorkommen. In Bakterien fungieren diese Strukturen zum Beispiel als Transkriptionsterminator, in den Chloroplasten sind sie wichtige Determinanten für die eigentliche mRNA Stabilität (Monde *et al.*, 2000). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass bestimmte Mutationen innerhalb der inverted repeats zu einer deutlichen Instabilität und somit zu einem schnellen RNA-Abbau führen (Stern *et al.*, 1989). Destabilisierende Sequenzen innerhalb der 3'UTR-Regionen können die mRNA Stabilität deutlich beeinflussen. Bisher wurden einige dieser Sequenzen identifiziert, darunter eine Sequenz, die durch elf Kopien eines AUUUA-Motivs gekennzeichnet ist. Wird diese Basenfolge in ein spezifisches Reportergen eingebracht, resultiert dies in einer schnellen Degradation des entsprechenden Transkripts (Green, 1993). Solche Sequenzen können auf unterschiedliche Weise den RNA-Abbau in kerntransformierten Pflanzen herbeiführen. Zum einen kann die polyA-Deadenylierung erhöht werden, was einen schnellen Abbau zur Folge hat, zum anderen können diese instabilen Sequenzen auch Endoribonukleasen aktivieren (Green, 1993). Die genauen Mechanismen des mRNA-Abbaus sind vor allem im Fall der Plastiden-RNA bisher noch nicht ausreichend charakterisiert, verschiedene Studien konnten allerdings zeigen, dass die Regulation der Genexpression in den Chloroplasten vermutlich in erster Linie auf die RNA-

Stabilität als auf die generelle Transkriptionsregulierung zurückzuführen ist (Quesada-Vargas *et al.*, 2005). Somit können diese Ursachen auch für den schnellen Abbau der CYP2A6-RNA nicht ausgeschlossen werden. Um diese Probleme zu umgehen, stehen vielfältige Möglichkeiten zur Verfügung, die getestet werden müssten. In erster Linie sollte generell die Transkription und Translation des Transgens gesteigert werden, in diesem Fall ist die Methode der transienten Expression allerdings keine Alternative. Eine generelle Steigerung der Transkription kann durch mehrere Faktoren erzielt werden. Eine Möglichkeit wäre es, einen synthetischen Promotor zu verwenden, der aus Elementen verschiedener Promotoren besteht. Comai *et al.* konnten zeigen, dass bei Verwendung eines Promotors, der sich aus Elementen des 35S-Promotors und aus Elementen des *A. tumefaciens* Ti-Plasmids zusammensetzte, eine deutlich höhere Aktivität des Promotors und somit eine wesentlich gesteigerte Proteinakkumulation zu verzeichnen war. Da diese Ergebnisse nach einer Kerntransformation von Tabakpflanzen erhalten worden waren, müsste untersucht werden, ob sich diese Methode auch auf Chloroplasten-transformierte Pflanzen anwenden lässt (Comai *et al.*, 1990; Streatfield *et al.*, 2007). Auch das Einbringen zusätzlicher regulatorischer Sequenzen (attachment-Regionen) in der Nähe des Promotors, könnte zu höheren Proteinausbeuten führen (Allen *et al.*, 1996). Eine weitere Möglichkeit wäre die zusätzliche Expression von Transkriptionsfaktoren, da gezeigt werden konnte, dass bei Transformation von Reis-Embryonen eine Steigerung der Transkriptionsrate um das zwei- bis vierfache erzielt werden kann (Yang *et al.*, 2001). Trotzdem müsste für diese transgenen CYP2A6-Linien zunächst genauer untersucht werden, ob die niedrige RNA-Ausbeute auf eine geringe Aktivität des Promotors zurückzuführen ist. Ist dies nicht der Fall, muss zunächst geklärt werden, durch welche Faktoren die RNA-Stabilität beeinträchtigt wird.

5.2 Optimierung des Expressionssystems

Die Expression des humanen CYP2A6 durch Verwendung der Vektoren pNT2 und pRB95 in den Chloroplasten konnte nachgewiesen werden. Es sollte nun aber die Gensequenz, als auch das Expressionssystem optimiert werden, um eine höhere RNA- als auch eine bessere Proteinausbeute zu erhalten.

Die modifizierte CYP2A6-Sequenz (2A6opt), die von der Firma Mr. Gene bezogen wurde, wurde zuvor Kodon-optimiert und enthielt im Vergleich zu den bisher verwendeten Sequenzen zusätzlich am N-Terminus drei Aminosäuren. Diese Kodonoptimierung des gesamten Gens sollte zu einer verbesserten Proteinexpression des humanen Cytochroms führen und eventuell die RNA-Stabilität erhöhen (Angov, 2011). Desweiteren wurde ein alternativer Expressionsvektor verwendet, der Vektor pKP9, ein modifizierter Vektor, der zur

erfolgreichen Integration ins Chloroplastengenom, genau wie der zuvor verwendete Vektor pRB95, die plastidären Gene *psaB-rps14-trnFM* und *trnG-psbZ* trägt. Hier wird die Transkription von *CYP2A6* jedoch durch den konstitutiven Promotor *prn* reguliert. Im Hinblick auf die Tatsache, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Indol als Substrat für das *CYP2A6* durch die Tabakpflanzen zur Verfügung gestellt werden kann, wurden zusätzlich BX1-exprimierende Pflanzen mit dem optimierten Transgen transformiert. Das Transgen *CYP2A6* konnte für alle erzeugten Kalluskulturen beziehungsweise für die daraus resultierenden Keimlinge mittels PCR nachgewiesen werden. Erste Probleme zeigten sich nach Restriktionsverdau der isolierten DNA und anschließendem Southern Blot zum Test der Linien auf Homoplasmie. Für Pflanzen der Linie p2A6opt-4701 konnte zu keiner Zeit ein spezifisches Signal detektiert werden. Für drei von fünf Pflanzen der Linie BX1 + p2A6opt-4701 konnten Signale der errechneten Fragmentgröße detektiert werden. Es wurden keine kleineren Fragmente, die auf einen heteroplastischen Zustand der Pflanze hindeuten würden, detektiert. Allerdings konnte dieses kleinere Fragment auch nicht für Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen werden. Da diese Versuche gegen Ende der Arbeit durchgeführt wurden, konnte in Ermangelung an Zeit keine andere Sonde synthetisiert und somit kein nochmaliger Southern Blot erfolgen. Trotzdem wurden diese Linien auf Vorhandensein des *CYP2A6* Transkripts getestet. Für Pflanzen der Linie p2A6opt-4701 konnte zu keiner Zeit die entsprechende RNA detektiert werden, auch die Bildung von Indican nach Indolzugabe konnte nicht nachgewiesen werden. Es konnte zwar ein Proteinsignal detektiert werden, trotzdem wurde aufgrund der anderen negativen Ergebnisse davon ausgegangen, dass es sich dabei um eine unspezifische Bindung des Antikörpers handelte. Es muss davon ausgegangen werden, dass diese Linien nicht transgen waren. Dagegen konnte für Pflanzen der Linie BX1 + p2A6opt-4701 ein starkes RNA-Signal detektiert werden, auch die Wiederholung des Versuchs mit Blattmaterial älterer Individuen zeigte ebenfalls erfolgreich die Transkription des Gens. Im Gegensatz zu den beschriebenen Beobachtungen unter 5.1 kam es in diesem Fall nicht zu einem schnellen Abbau der RNA, zumindest nicht in Pflanzen, die in Zellkultur kultiviert wurden. Generell waren die RNA-Level deutlich höher, was auf die Verwendung des Promotors *prn* zurückzuführen sein könnte. Im Folgenden wurde Blattmaterial dieser Pflanzen auf die Bildung des Proteins *CYP2A6* als auch auf dessen Funktionalität getestet. Ein spezifisches Proteinsignal konnte nicht detektiert werden, allerdings konnte die Funktionalität erfolgreich nachgewiesen werden. Eine Indican-Zone wurde nach Durchführung einer Dünnschichtchromatographie detektiert. Diese Pflanzen waren somit in der Lage, das durch das Enzym BX1 bereitgestellte Indol zu hydroxylieren und zu speichern. Doch auch hier waren die Indican-Level sehr gering, da auch kein Protein nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die geringe Indican-Bildung mit sehr geringen Mengen an Protein korreliert. Generell ist die Translationseffizienz

abhängig von der Basenzusammensetzung, der Länge und der Sekundärstruktur der 5'-UTR sowie dem G/C-Gehalt der mRNA. Da das in diesem Fall verwendete Gen *2A6opt* für eine geeignete Expression entsprechend synthetisch hergestellt wurde, können diese Faktoren eigentlich ausgeschlossen werden. Weiterhin wird die stabile Akkumulation rekombinanter Proteine in den Plastiden durch viele Faktoren kontrolliert. Es wurden bisher drei Faktoren identifiziert, deren genaue Funktion trotz langjährigem Studium noch nicht vollständig geklärt ist. Dazu zählt unter anderem die Aktivität von Methionin-Aminopeptidasen. Die Entfernung des N-terminalen Methionin ist vermutlich ein kritischer Punkt bezüglich der Stabilität und Funktion eines Proteins, sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen (Apel *et al.*, 2010). So führte die Expression einer zytotoxischen Ribonuklease in *E. coli*, deren Methionin nicht entfernt wurde, zu einer deutlich geringeren katalytischen Aktivität und reduzierten Thermostabilität (Newton *et al.*, 1998; Millan *et al.*, 2007). Folgt der Aminosäure Methionin ein Alanin, ein Glycin, ein Serin oder ein Valin, findet die Entfernung des Methionin in der Regel statt (Giglione *et al.*, 2003). Im Falle des optimierten 2A6 folgt dem Methionin die Aminosäure Alanin, sodass das Protein eigentlich korrekt prozessiert werden müsste. Desweiteren ist die Stabilität generell von der Sequenz des N-Terminus abhängig. Es gilt die Regel, dass die Halbwertszeit eines Proteins mit der Identität des N-Terminus korreliert (Apel *et al.*, 2010; Varshavsky *et al.*, 1996). Spezifische Aminosäuren innerhalb der N-terminalen Sequenz können das Protein entweder stabilisieren oder auch destabilisieren. Diese sogenannte N-end-rule konnte bereits für verschiedene rekombinante Proteine nachgewiesen werden. Apel *et al.* exprimierten unter anderem verschiedene Varianten des *psbE* Gens in Tabak und konnten feststellen, dass die Aminosäuren Glutamin und Valin die Proteine stabilisierten, hingegen die Aminosäuren Cystein und Histidin zur Instabilität der Proteine beitragen. Der Grund für diese Instabilität ist allerdings bisher noch nicht geklärt (Apel *et al.*, 2010). Da die N-terminale Sequenz des optimierten 2A6 an dritter Stelle ein Histidin enthält, könnte dies ein Grund für die Instabilität des Proteins sein. Ein weiterer kritischer Faktor der die Protein-Stabilität bedingt, ist die proteolytische Aktivität verschiedener endogener Proteasen (Adam, 2000). Auch sind für viele Proteine unterschiedlicher Organismen spezifische Abbau-Signale bekannt, sogenannte N-Degrone. Ob diese Signale auch in den Chloroplasten aktiv sind, ist jedoch noch unklar (Apel *et al.*, 2010). So zeigte sich, dass bei Expression des VP6 Proteins des Rotavirus, trotz hoher RNA-Level, die Akkumulation des Proteins sehr gering war. Dies führte zu der Vermutung, dass der Proteinabbau auf proteolytische Aktivitäten in den Chloroplasten zurückzuführen ist (Birch-Machin *et al.*, 2004). Andere Arbeitsgruppen konnten bezüglich der Proteinstabilität ähnliche Beobachtungen, wie sie im Fall von CYP2A6 auftreten, verzeichnen. Bellucci *et al.* exprimierten das Protein β -Zein aus Mais, sowohl im Cytosol als auch in den Chloroplasten von Tabakpflanzen. Trotz hoher Transkriptionsraten konnte das Protein nicht detektiert werden. Die fehlende Akkumulation wurde hier mit der Aktivität endogener Proteasen und

dem Fehlen spezifischer Chaperone in Verbindung gebracht (Bellucci *et al.*, 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Expression des humanen Hämoglobins in den Plastiden von Tabak erhalten. Das Fehlen des Proteins wurde in diesem Fall mit einer ineffizienten Initiation der Translation als auch mit der schnellen Proteolyse des Hämoglobins erklärt (Magee *et al.*, 2004). Ein weiteres, der CYP2A6 Expression ähnliches Beispiel, ist die Expression des HIV-1 Proteins p24. Dieses wurde in zwei unterschiedlichen Varianten exprimiert. Die Bildung der einen Proteinvariante konnte ausschließlich in sehr jungen Keimlingen nachgewiesen werden, die Bildung der anderen Proteinvariante war in allen Entwicklungsstadien stabil. Auch hier wird diese Beobachtung mit Unterschieden in der N-terminalen Sequenz und dem daraus resultierenden Abbau des Proteins in Verbindung gebracht (McGabe *et al.*, 2008). Die möglichen Gründe für das Fehlen oder den Abbau des Proteins CYP2A6 müssten demnach durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Es existieren aber auch verschiedene Methoden, unabhängig der N-terminalen Aminosäuresequenz, die die Proteinstabilität und die Proteinakkumulation deutlich steigern können. Eine Möglichkeit ist die Fusion des gewünschten Proteins mit einem für das verwendete Expressionssystem endogenen Protein, welches generell in großer Menge in einem bestimmten Entwicklungsstadium des Organismus vorliegt und somit als Carrier fungiert. So wurde das Gen einer β -Glucuronidase mit einem Gen, das für ein Oleosinprotein in *Brassica napus* kodiert, fusioniert. Das Fusionsprotein akkumulierte dadurch in größerer Menge in den Ölkörpern der Samen (van Rooijen und Moloney, 1995). Auch konnte die Fusion einer β -Glucuronidase mit dem C-Terminus einer Ubiquitineinheit zu einer 10fach erhöhten Proteinakkumulation in transgenen Kartoffelpflanzen führen (Garbarino *et al.*, 1995). Eine weitere Methode, die Proteinakkumulation zu steigern, ist das Targeting des gewünschten Proteins gleichzeitig zu zwei verschiedenen Organellen. Hyunjong *et al.* modifizierten das Gen für Xylanase am N-Terminus als auch am C-Terminus, sodass das gebildete Protein in die Chloroplasten und in die Peroxisomen transportiert wurde. Im Gegensatz zu Pflanzen, die das Protein in nur einem Organell exprimierten, zeigten diese Linien deutlich höhere Proteinakkumulationsraten (Hyunjong *et al.*, 2005). Diese beschriebenen Methoden wurden bisher allerdings nur an Pflanzen getestet, deren Kerngenom transformiert war, sollten aber für eine Erhöhung der Expression in transplastomen Pflanzen nicht ausgeschlossen werden.

5.3 Substratinhibition durch Nikotin

Wie bereits erwähnt, zeigen humane Cytochrom-P450-Monooxygenasen eine sehr große Substratspezifität. Vor allem Enzyme der Familien CYP1, CYP2 und CYP3 metabolisieren eine große Anzahl ähnlich aufgebauter Substanzen (Guengerich, 2002). Aufgrund dessen

werden diese Cytochrome oft genutzt, um neue biochemische Reaktionen und somit neue Sekundärmetabolite in transgenen Pflanzen einzuführen. Diese Substratspezifität könnte im Fall der Expression des CYP2A6 in Tabakpflanzen ein Problem darstellen. In den Tabakpflanzen läuft die Bildung von Nikotin ausgehend von Putrescin über den Pyridinalkaloid-Syntheseweg. Einige der an der Nikotin-Synthese beteiligten Enzyme konnten bereits identifiziert werden, der größte Teil ist allerdings bisher noch unbekannt (Häkkinen *et al.*, 2007). Bekannt ist auch, dass das humane CYP2A6 im menschlichen Organismus in der Lage ist, die Metabolisierung von Nikotin zu 5'-Hydroxynikotin, das dann wiederum zu Cotinin metabolisiert wird, zu katalysieren (Le Gal *et al.*, 2003). Das in der Leber gebildete Cotinin ist in der Regel kein natürlicher Bestandteil in der Tabakpflanze. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Expression der CYP2A6-cDNA im Kern von *Nicotiana tabacum*, nachweisbare Mengen an Cotinin detektierbar waren. Das exprimierte Protein katalysierte somit die Hydroxylierung von Nikotin zu 5'-Hydroxynikotin, aus dem dann Cotinin entstehen kann (Dueckershoff *et al.*, 2005). Die Nutzung von Nikotin als Substrat könnte demnach ein weiterer Faktor sein, der die Synthese von Indoxyl bzw. Indican beeinflusst. So ist nicht auszuschließen, dass das Cytochrom bei Expression in Tabakpflanzen das Substrat Nikotin bevorzugt metabolisiert und aus diesem Grund das bereitstehende Indol als Substrat nicht effektiv genug genutzt wird. Da ja auch relativ große Mengen an Nikotin zur Verfügung stehen, könnte dies eine mögliche Erklärung dafür sein, dass bei einer Konkurrenz um die Substratbindestelle des Enzyms das ohnehin schon gering akkumulierte Protein CYP2A6 sehr wenig Indol metabolisiert und somit nur geringe Mengen an Indican nachweisbar waren. Eine Möglichkeit wäre es, zusätzlich die Bildung von Nikotin durch Ausschalten wichtiger Enzyme innerhalb des Syntheseweges zu unterdrücken. Da der Syntheseweg allerdings sehr komplex und nicht vollständig geklärt ist, wäre der experimentelle Aufwand dafür wahrscheinlich zu groß. Es wäre also dann zu überlegen, ob sich für die Expression von CYP2A6 eine Nikotin-arme oder eine Nikotin-freie Tabakspezies besser eignen würde.

5.4 Charakterisierung der NADPH-Reduktase ATR2

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die NADPH-Reduktase ATR2 aus *Arabidopsis thaliana* näher charakterisiert, um zu untersuchen, in wie weit eine pflanzliche Reduktase als Elektronendonator für das humane Cytochrom CYP2A6 innerhalb der Chloroplasten dienen kann.

Bis heute konnten nur zwei Cytochrom-P450-Monooxygenasen identifiziert werden, die eine Chloroplastenlokalisationssequenz aufweisen und nachweislich in den Chloroplasten transportiert werden. Zum einen ist das die Allenoxidsynthase (AOS) aus der Tomate, die

ebenfalls die typische N-terminale Signalsequenz für eine Chloroplastenlokalisierung aufweist (von Heijne *et al.*, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym zur inneren Hüllmembran der Chloroplasten transportiert und dort verankert wird (Froehlich *et al.*, 2001). Erstaunlicherweise zeigt dieses Enzym keine Affinität zu Kohlenstoffmonoxid und benötigt ebenfalls kein Elektronentransportsystem, also keine NADPH-Reduktase für eine korrekte Funktion, da die AOS die benötigten Reduktionsäquivalente selbst bereitstellt (Song & Brash, 1991). Das zweite Beispiel für ein Cytochrom, das in den Chloroplasten vorkommt, ist das CYP86B1 aus *A. thaliana*. Die Aminosäuresequenz zeigt auch hier einen hohen Serinanteil, der zur Chloroplastenlokalisierung führen soll. Watson *et al.* exprimierten die cDNA dieses Proteins in der Erbsenpflanze und konnten die äußere Hüllmembran der Chloroplasten als Lokalisationsort nachweisen. Durch diese Lokalisation des Proteins, dem bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte, scheint eine Kooperation mit der ER-Reduktase unmöglich, sodass auch in diesem Fall ein anderer Mechanismus der Elektronenbereitstellung erfolgen muss (Watson *et al.*, 2001). Da über entsprechende Chloroplasten-lokalisierte NADPH-Reduktasen bisher nichts bekannt ist, wurde aufgrund dieser Beobachtungen die NADPH-Reduktase ATR2 genauer charakterisiert. Das Sequenzanalyse-Programm TargetP sagt für die Reduktase ATR2 eine mögliche Lokalisation in den Chloroplasten voraus, da dieses Protein die typische Serin-haltige N-terminale Signalsequenz aufweist. Auch das Vorhandensein der für Bakterien typischen Lipobox könnte eventuell in Pflanzen zu einer Lipidierung und somit zur Verankerung in der Membran führen. Aufgrund dieser Merkmale könnte ATR2 als pflanzlicher Kandidat für eine Co-Expression, zusammen mit CYP2A6, in Betracht gezogen werden.

5.4.1 Lipidierung und Lokalisation von ATR2 in Bakterienzellen

Proteine, die in prokaryotischen, Gram-negativen Organismen, wie zum Beispiel *E. coli*, lipidiert werden, zeigen alle eine typische Struktur innerhalb ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz. Dieses Signalpeptid setzt sich aus einem positiv geladenen N-Terminus, aus einer hydrophoben Region und aus einer Konsensus-Lipobox-Sequenz mit einem stark konservierten Cystein zusammen (Hayashi & Wu, 1990). Das unmodifizierte Protein wird anhand des N-terminalen Signalpeptids erkannt und wird an der Cytoplasmamembran, an der auch die Enzyme lokalisiert sind, welche für die Lipidierung benötigt werden, assoziiert. Zunächst wird ein Diacylglycerol-Molekül auf die freie SH-Gruppe des konservierten Cysteins übertragen. Danach erfolgt die proteolytische Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz, wobei eine freie Aminogruppe am Cystein entsteht. Im letzten Schritt der Lipidierung wird eine variable Fettsäure an die freie Aminogruppe des

Cystein angeheftet (Sankaran & Wu, 1994). Die sehr große Sequenzähnlichkeit und das Vorhandensein der typischen Lipobox der Reduktase ATR2 lässt vermuten, dass dieses Protein bei Expression in Bakterien ebenfalls einen Lipidanker erhält. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass dieser Mechanismus auch in Pflanzen abläuft, das Protein lipidiert und dadurch in den Membranen verankert wird (Hennig *et al.*, 2007). Um das zu überprüfen, wurde die Reduktase ATR2 zunächst in Bakterien exprimiert, um zu überprüfen, ob die eukaryotische Signalsequenz inklusive Lipobox als solche erkannt wird und eine Lipidierung möglich ist.

Es wurden acht unterschiedliche Konstrukte in *E. coli* Origami-Zellen exprimiert und hinsichtlich ihrer Lokalisation und Lipidierung untersucht. Tabelle 5.2 zeigt noch einmal zusammenfassend die verschiedenen Charakteristika der verwendeten Konstrukte und die Ergebnisse der Analysen.

Tabelle 5.2. Nomenklatur, Lokalisation und Lipidierung der verschiedenen Proteinvarianten.

Tabellarische Auflistung aller Konstrukte, deren Sequenz-Charakteristika und die Ergebnisse der Membranproteinfraktionierung sowie der *in vivo*-Isotopenmarkierung. +: Positiv bezüglich Membranassoziation und Inkorporation von Palmitinsäure; -: negativ bezüglich Membranassoziation und Inkorporation von Palmitinsäure.

| Konstrukt | Signalsequenz | Lipobox | Membran- assoziation | Inkorporation von Palmitinsäure |
|--------------|---------------|---------|-------------------------|------------------------------------|
| 5'ATR2-11 | vollständig | LIGC | + | + |
| 5'ATR2-12 | verkürzt | LIGC | + | + |
| 5'ATR2-13 | fehlend | LIGC | + | keine Aussage |
| 5'ATR2-14 | fehlend | LIGC | + | keine Aussage |
| 5'ATR2mut-11 | vollständig | LIGG | + | - |
| 5'ATR2mut-12 | verkürzt | LIGG | + | - |
| 5'ATR2mut-13 | fehlend | LIGG | + | keine Aussage |
| 5'ATR2mut-14 | fehlend | LIGG | + | keine Aussage |

Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde anhand einer Membranproteinfraktionierung untersucht. Dabei erfolgte die Trennung der Bakterienlysate in Membranfraktionen und cytosolische Fraktionen. Es konnte gezeigt werden, dass alle acht Proteinvarianten in den jeweiligen Membranfraktionen detektierbar sind. Unabhängig von der Länge bzw. des Fehlens der N-terminalen Signalsequenz, sowie unabhängig von der Mutation der Lipobox werden alle untersuchten Proteinvarianten mit bakteriellen Membranen assoziiert. Dieses Ergebnis stimmt somit auch mit den Ergebnissen von Hull *et al.* überein, die zeigten, dass eine modifizierte Form der Reduktase ATR2 in der bakteriellen Membranfraktion detektierbar und funktionell ist (Hull *et al.*, 2000). Hier konnte gezeigt werden, dass es nicht zwingend

notwendig ist, die N-terminale Signalsequenz zu entfernen, um eine effiziente Expression im bakteriellen System zu ermöglichen (Halkier *et al.*, 1995; Barnes, 1996). Die Vermutung, dass eventuell nur die Proteine mit vollständiger Signalsequenz erkannt und in den Membranen verankert werden lässt sich damit widerlegen. Aussagen über den Mechanismus der Membranassoziation können allerdings durch diese Ergebnisse nicht getroffen werden. Deshalb sollte im Folgenden der Einbau radioaktiv-markierter Palmitinsäure, also eine mögliche Lipidierung der Proteine, in Abhängigkeit der Länge der Signalsequenz sowie der Mutation der Lipobox mittels *in vivo*-Isotopenmarkierung untersucht werden. Eine Inkorporation von [9,10-³H] Palmitinsäure konnte für die Konstrukte 5`ATR2:YFP-11 und -12, die entweder die vollständige oder die verkürzte N-terminale Signalsequenz aufweisen, detektiert werden. Wie vermutet, wird das vollständige Signalpeptid (5`ATR2:YFP-11) durch die an der Lipidierung beteiligten bakteriellen Enzyme erkannt. Die Palmitinsäure wird an die freie Aminogruppe des konservierten Cystein angeheftet. Ebenso konnte der Einbau der Palmitinsäure für Proteinvariante 5`ATR2:YFP-12 mit unvollständiger N-terminaler Sequenz nachgewiesen werden. Damit wäre gezeigt, dass das pflanzliche Signalpeptid nicht in vollständiger Länge vorliegen muss. Eine gewisse Mindest-Länge scheint in diesem Fall für eine Lipidierung ausreichend zu sein. Daraus kann geschlossen werden, dass die in den Membranfraktionen detektierten Proteine 5`ATR2:YFP-11 und 5`ATR2:YFP-12 tatsächlich durch die Anheftung einer Fettsäure in der Cytoplasmamembran verankert werden. Für die zugehörigen mutierten Proteinvarianten (5`ATR2mut:YFP-11 und 5`ATR2mut:YFP-12) konnte keine Inkorporation der Palmitinsäure detektiert werden. Es wurde gezeigt, dass auch die Lipidierung des eukaryotischen Proteins tatsächlich nur dann erfolgt, wenn ein konserviertes Cystein innerhalb der Lipobox vorliegt. Die daran gebundene Palmitinsäure fungiert dabei als hydrophober Anker (Khandelia *et al.*, 2008). Bei Austausch gegen ein Glycin wird die Anheftung der Fettsäure verhindert. Trotzdem wurden auch die mutierten Proteine in den Membranfraktionen nachgewiesen. Somit findet die Verankerung in oder an der Membran dieser mutierten Varianten durch andere Mechanismen statt. Generell ist bekannt, dass die meisten NADPH-Reduktasen eine sehr hydrophobe Aminosäuresequenz innerhalb ihres N-Terminus aufweisen, aber auch hydrophile Segmente mit geladenen Resten besitzen (Monier *et al.*, 1988; Black & Coon, 1982). Im Fall der mutierten Varianten, die ja die vollständige beziehungsweise verkürzte N-terminale Sequenz aufweisen, scheint die Verankerung in den Membranen durch die vorhandenen hydrophoben Regionen, die eventuell im Gegensatz zu bakteriellen Lipoproteinen nicht abgespalten werden, auszureichen. Wie die hydrophobe Domäne an den Lipiden bindet, ist allerdings bisher noch unklar. Über eine mögliche Lipidierung der Varianten ohne N-terminale Signalsequenz (5`ATR2:YFP-13/5`ATR2mut:YFP-13 und 5`ATR2:YFP-14/5`ATR2mut:YFP-14) lässt sich keine genaue Aussage treffen, da die zuvor parallel als Kontrolle in *E. coli* exprimierten Proteine generell

eine sehr schwache Expression zeigten. Sodass die Wahrscheinlichkeit sehr hoch ist, dass viel zu wenig Protein für einen detektierbaren Einbau der Palmitinsäure vorlag. Die Vermutung ist aber, dass diese Varianten ohne Signalsequenz, unabhängig vom Vorhandensein oder dem Fehlen des essentiellen Cystein, nicht als zu lipidierende Proteine erkannt werden und die Bindung der Fettsäure demnach ausbleibt. Wie bereits erwähnt, konnten diese Varianten in den Membranfraktionen detektiert werden, sodass auch hier die Membranassoziation über andere Mechanismen erfolgen muss. Da sich diese Proteine durch das Fehlen der hydrophoben N-terminalen Signalsequenz auszeichnen, kann dies kein Grund für eine Bindung an den Membranen sein. Möglich wäre auch, dass der restliche Teil des N-Terminus noch lipophil genug ist und ein Targeting zur Plasmamembran möglich macht. Weiterhin ist bekannt, dass viele Proteine, die keine hydrophobe N-terminale Signalsequenz aufweisen, trotzdem in der Lage sind, sich in die Membran zu integrieren. Dies ist meist auf eine generelle Hydrophobizität des kompletten Proteins, unabhängig vom N-Terminus, zurückzuführen, und könnte auch für die ATR2-Varianten in Frage kommen (Pratt *et al.*, 1986). Es konnten aber auch bereits Proteine charakterisiert werden, die durch das Fehlen jeglicher hydrophober Strukturen gekennzeichnet sind und trotzdem in der Membran verankert werden. Als Beispiel seien hier die Penicillin-Bindeproteine aus *E. coli* aufgeführt. Der C-Terminus dieser Proteine bildet alpha-Helices aus, die sich dann in der Membran verankern. Dabei scheinen kationische Reste innerhalb der hydrophilen Region eine Rolle zu spielen (Harris *et al.*, 2002). Als weitere Möglichkeiten einer Membranassoziation wären einfache elektrostatische Wechselwirkungen, unspezifische Bindungen durch physikalische Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Proteinen und den Membranen zu nennen. Desweiteren können ebenso Protein-Protein-Interaktionen an der Verankerung in der Membran beteiligt sein. Zum Beispiel können periphere Membranproteine an die Lipidkopfgruppen anderer integraler Membranproteine binden. Die Reduktase ATR2 konnte erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Die N-terminale Signalsequenz sowie die für Bakterien spezifische Lipobox wurden erkannt, und eine Lipidierung konnte nachgewiesen werden. Somit konnte nun überprüft werden, ob das Vorhandensein der Lipobox auch in Pflanzen als Lipidierungssignal fungiert und eine Lokalisation von ATR2 in den Chloroplasten durch die vorhergesagte Chloroplasten-signalsequenz stattfindet.

5.4.2 Lipidierung und Lokalisation von ATR2 nach transienter Expression

Nachdem die Reduktase ATR2 erfolgreich in *E. coli* exprimiert wurde, konnte nun die Lokalisation und eine mögliche Lipidierung in Pflanzenzellen untersucht werden. Gewählt

wurde hier die Methode der transienten Expression unter Verwendung des ICON-Systems, die eine Expression des gewünschten Proteins in sehr kurzer Zeit möglich macht, ohne aufwendige Anzucht und Regenerationszyklen, wie es typischerweise bei einer Kern- oder Chloroplastenexpression der Fall ist (Marillonet *et al.*, 2004; 2005). Es wurden neun ATR2-Varianten transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Im Unterschied zur bakteriellen Expression wurde hier zusätzlich eine Volllänge-Variante verwendet, die innerhalb der Signalsequenz keinen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin aufweist, und somit der originalen ATR2 Sequenz entspricht. Die anderen acht Proteinvarianten waren analog zu den in *E. coli* exprimierten Proteinen. Tabelle 5.3 zeigt noch einmal zusammenfassend die verschiedenen Charakteristika der verwendeten Konstrukte und die Ergebnisse der Untersuchungen zur Lokalisation und Lipidierung.

Tabelle 5.3. Nomenklatur, Lokalisation und Lipidierung der verschiedenen Proteinvarianten. Tabellarische Auflistung der verwendeten Konstrukte, deren Sequenz-Charakteristika und die Ergebnisse der CLSM-Aufnahmen sowie der *in vivo*-Isotopenmarkierung. +: Positiv bezüglich Membranassoziation und Inkorporation von Palmitinsäure; -: negativ bezüglich Membranassoziation und Inkorporation von Palmitinsäure; ER: Endoplasmatisches Retikulum; CP: Cytoplasmamembran; ÄC: Äußere Chloroplastenmembran.

| Konstrukt | Signalsequenz | Lipobox | Membran- assoziation | Inkorporation von Palmitinsäure |
|---------------|---------------------------------|---------|-------------------------|------------------------------------|
| 5' ATR2-21L | vollständig (ohne AS-Austausch) | LIGC | + (ER/CP/ÄC?) | - |
| 5' ATR2-21 | vollständig (mit AS-Austausch) | LIGC | + (ER/Endosom?) | - |
| 5' ATR2-22 | verkürzt | LIGC | + (ER/Endosom?) | - |
| 5' ATR2-23 | fehlend | LIGC | + (ER/Endosom?) | - |
| 5' ATR2-24 | fehlend | LIGC | keine Aussage | - |
| 5' ATR2mut-21 | vollständig | LIGG | + (ER/CP?) | - |
| 5' ATR2mut-22 | verkürzt | LIGG | + (ER/Endosom?) | - |
| 5' ATR2mut-23 | fehlend | LIGG | + (ER/Endosom?) | - |
| 5' ATR2mut-24 | fehlend | LIGG | + ER/Endosom?) | - |

Da bei allen Pflanzen sieben Tage nach Infiltration fluoreszierende Bereiche detektiert worden waren, konnten stoffwechselaktive Protoplasten isoliert und zunächst mittels Immunoblot auf Vorhandensein der Proteine getestet werden. Es zeigte sich, dass bis auf die kürzeste, nicht-mutierte Variante 5' ATR2:YFP-6324, alle Varianten erfolgreich exprimiert werden konnten. Im Vergleich zur Proteinakkumulation nach Chloroplastenexpression konnten durch die transiente Expression schon deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden, allerdings scheinen diese für eine transiente Expression immer noch sehr gering. Von allen

infiltrierten Pflanzen wurden nun stoffwechselaktive Protoplasten isoliert und die Lokalisation der rekombinanten Proteine unter Verwendung des CLSM untersucht. Parallel dazu wurden dieselben Protoplasten einer *in vivo*-Isotopenmarkierung unterzogen. Die wohl wichtigste Beobachtung konnte anhand des Proteins 5`ATR2:YFP-6121L mit der originalen ATR2 Sequenz gemacht werden. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten eindeutig, dass sich das Protein nicht in den Chloroplasten befindet. Es konnte eine eindeutig membranassoziierte Lokalisation festgestellt werden. Die genaue Lokalisation kann allerdings nur vermutet werden. Möglich wäre eine Assoziation mit der Cytoplasmamembran als auch mit dem ER. Wobei die Lokalisation am ER durchaus wahrscheinlicher ist, da die meisten Cytochrome ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert sind. Das Protein könnte sogar an der äußeren Chloroplastenmembran, ins Cytosol ragend, verankert sein. Somit wäre allerdings gezeigt, dass die N-terminale Signalsequenz der Reduktase ATR2, für die eine Chloroplastenlokalisation vorhergesagt wurde (Hull *et al.*, 2000) definitiv nicht zum Transport des Proteins in den Chloroplasten beiträgt und derartige Signalsequenzmotive nicht immer als richtig gewertet werden können. Auch konnten keine eindeutigen Signale bezüglich des Einbaus radioaktiver Palmitinsäure detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass keine Lipidierung zur Verankerung in der Membran erfolgte. Im Gegensatz zur bakteriellen Expression werden hier die Merkmale, die vollständige Signalsequenz und das Vorhandensein der Lipobox, nicht als Signal für eine Lipidierung erkannt. Die Verankerung des rekombinanten Proteins erfolgt in diesem Fall vermutlich durch die generelle Hydrophobizität des N-Terminus, wie dies für die meisten NADPH-Reduktasen beschrieben ist (Monier *et al.*, 1988; Black & Coon, 1982). Wie bereits unter 5.4 beschrieben, scheinen die einzigen bisher identifizierten, Chloroplasten-lokalisierten Cytochrome tatsächlich einen anderen Mechanismus zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten zu nutzen. Jensen *et al.* zeigten, dass es durch eine Licht-gesteuerte Reaktion unter Verwendung des Photosystems I *in vitro* möglich ist, die benötigten Elektronen für Cytochrome bereitzustellen. In Pflanzen erfolgt solch ein Licht-abhängiger Elektronentransport zum Beispiel während der Photosynthese. Eventuell sind auch derartige Reaktionen für die Versorgung der Cytochrome mit Elektronen innerhalb der Chloroplasten ohne Nutzung von NADPH-Reduktasen verantwortlich (Jensen *et al.*, 2011). Proteinvariante 5`ATR2:YFP-6321, die die vollständige N-terminale Sequenz, aber auch einen Aminosäureaustausch innerhalb des Serin-haltigen Abschnitts aufweist, wurde ebenfalls nicht in den Chloroplasten detektiert. Die in den Abbildungen zu erkennenden netzförmigen Strukturen lassen auf eine Verankerung des Proteins in der ER-Membran schließen. Diese Membranassoziation wiederum geht nicht auf die Bindung eines Lipidrestes an die Membran zurück, da auch für diese Variante keine Inkorporation von [9,10-³H] Palmitinsäure festgestellt werden konnte. Somit scheint auch hier die Verankerung in der Membran durch den hydrophoben N-Terminus zu erfolgen. Auch

lassen sich kleine, kugelige Strukturen erkennen, die auf eine Ansammlung des Proteins in Endosomen zurückzuführen sein könnte. Die gleichen Ergebnisse wurden für die zugehörige mutierte Variante erzielt. Dabei kann allerdings keine Aussage über den Effekt der Mutation innerhalb der Lipobox getroffen werden, da es auch zu keiner Lipidierung der nicht-mutierten Variante kam. Die Verankerung der mutierten Variante an der ER-Membran verhält sich vermutlich analog zur nicht-mutierten Variante, da auch hier vermutlich der hydrophobe N-Terminus dazu beiträgt. Für das Protein mit der verkürzten Signalsequenz (5'ATR2:YFP-6322) sowie für die zugehörige mutierte Variante (5'ATR2mut:YFP-6322) konnte die ER-Membran als Lokalisationsort detektiert werden. Dies lässt sich anhand der netzförmigen Strukturen, die fast den kompletten Protoplasten durchziehen, erkennen. Aber auch hier wurden kugelige Strukturen detektiert, die durch eine Akkumulation der Proteine in kleineren Endosomen entstanden sein könnten. Es könnte sich vermutlich um falsch gefaltete Proteine handeln, die somit nicht in den Membranen verankert werden können und zum proteolytischen Abbau in den Endosomen gespeichert werden. Eine andere Vermutung wäre die Bildung von kleineren Proteinaggregaten, die sich dann an die Membran anlagern und als runde Strukturen sichtbar sind (Khandelia *et al.*, 2008). Die eindeutig nachgewiesene Membranassoziation erfolgte wahrscheinlich auch hier über hydrophobe Wechselwirkungen des (verkürzten) N-Terminus mit den Membranen, da keine Lipidierung der Proteine mit [9,10-³H] Palmitinsäure erfolgte. Für alle anderen Proteine mit komplett fehlender Signalsequenz (5'ATR2:YFP-6323, 5'ATR2mut:YFP-6323 und 5'ATR2mut:YFP-6324) ließ sich keine Lipidierung nachweisen. Da auch die Proteine mit vollständiger Signalsequenz und nicht mutierter Lipobox nicht als zu lipidierende Proteine in der Pflanze erkannt werden, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Demzufolge kann (in Pflanze) keine Aussage über die Abhängigkeit einer Lipidierung von der Signalsequenz oder der Mutation der Lipobox getroffen werden. Die unvollständigen Varianten konnten trotzdem als eindeutig membranassoziierte Proteine identifiziert werden. Ähnlich wie für die Expression in Bakterien stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen diese in der Membran verankert sind. Entweder erfolgt die Bindung an der Membran durch eine generelle Hydrophobizität des kompletten Proteins, unabhängig vom N-Terminus (Pratt *et al.*, 1986), oder es kommt zur Ausbildung von Helices innerhalb des N-Terminus, was zu einer Verankerung in der Membran führt (Harris *et al.*, 2002). Da auch hier zusätzlich kleine, runde Strukturen detektiert werden konnten, scheint eine Bildung von Protein-Oligomeren, die dann die Membran umspannen, durch einfache elektrostatische Wechselwirkungen oder unspezifische Bindungen nicht ausgeschlossen.

5.5 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Bildung des humanen CYP2A6 in aktiver Form in den Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* prinzipiell möglich ist. Dennoch konnten entgegen den Erwartungen keine hohen Proteinausbeuten erzielt werden, da einerseits auf Transkriptionsebene Probleme bezüglich der Stabilität der RNA auftraten und andererseits die Proteinstabilität nicht gegeben war. Trotz der Vermutung, dass in den Chloroplasten keine Glykosyltransferasen aktiv sind, konnte nur die Bildung von Indican und keine detektierbare Indigosynthese nachgewiesen werden. Es ist durchaus möglich, dass Indoxyl in größerer Menge toxisch für die Pflanze ist und deshalb sehr schnell, unabhängig vom Bildungsort, metabolisiert wird. Dieser Schritt innerhalb der Biosynthese stellt somit einen limitierenden Faktor dar, der das gezielte Metabolic Engineering zur Änderung des Phänotyps von Pflanzen durch eine direkte Akkumulation des Farbstoffes Indigo unmöglich macht.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, dass die NADPH-Reduktase ATR2, für die eine Chloroplastenlokalisierung vorhergesagt wurde, tatsächlich nicht in den Chloroplasten geleitet wird. Da bisher keine Chloroplasten-lokalisierte NADPH-Reduktase identifiziert ist, kann davon ausgegangen werden, dass generell keine NADPH-Reduktasen in den Chloroplasten vorkommen. Diese Behauptung lässt sich durch die Beobachtung stützen, dass bis heute nur zwei Cytochrome bekannt sind, die nachweislich in beziehungsweise an den Chloroplasten lokalisiert sind und diese keine von NADPH-Reduktasen bereitgestellten Reduktionsäquivalente benötigen. Auch die Expression des humanen CYP2A6 im Chloroplastengenom ohne Co-Expression einer NADPH-Reduktase führte zur Bildung des aktiven Proteins. Sodass auch in diesem Fall die benötigten Reduktionsäquivalente durch andere Mechanismen bezogen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass heterologe Cytochrom-P450-Enzyme in aktiver Form in Pflanzen gebildet werden können. Das Eingreifen in den endogen pflanzlichen Metabolismus konnte am Beispiel des CYP2A6 bis zu einem gewissen Punkt erfolgreich gezeigt werden. Dieses und auch andere Beispiele zeigen deutlich, dass der Einsatz eukaryotischer Cytochrome für ein gezieltes Metabolic Engineering großes Potenzial besitzt, vor allem im Hinblick auf die Manipulation des Sekundärmetabolismus von pharmakologisch wichtigen Pflanzen.

6. Zusammenfassung

Cytochrom-P450-Enzyme als vielseitige Biokatalysatoren stellen bedeutende Werkzeuge für ein gezieltes Metabolic Engineering dar. Damit eröffnen sich vielfältige neue Möglichkeiten für einen gezielten Eingriff in den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel, vor allem in Hinblick auf die Erzeugung neuer pharmakologisch aktiver Substanzen in Medizinalpflanzen. Die Beobachtung, dass rekombinante *E. coli* Kulturen bei Expression des humanen CYP2A6 in der Lage waren, endogenes Indol zu hydroxylieren und zur Bildung von Indigo beizutragen, warf die Frage auf, ob ein Eingriff in den Sekundärmetabolismus von Tabakpflanzen ebenfalls zur Bildung von Indigo führen kann. Vorarbeiten zeigten, dass die Expression von CYP2A6 im Kerngenom nicht zur Bildung von Indigo, sondern lediglich zu einer geringen Synthese des Glycosids Indican führte. Da die Expressionslevel eher gering und auch nicht stabil waren, sollte in dieser Arbeit evaluiert werden, ob die Integration des Transgens CYP2A6 in das Chloroplastengenom zu einer gesteigerten Expression und auch zu einer höheren Akkumulationsrate der Metabolite führt. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob aufgrund des Fehlens von Glykosyltransferasen in den Chloroplasten die direkte Bildung von Indigo möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des humanen CYP2A6 im Chloroplastengenom unter Verwendung der Vektoren pNT2 und pRB95 und des Promotors *psbA* grundsätzlich möglich ist. Es stellte sich heraus, dass die Expressionslevel der transplastomen Pflanzen sehr gering waren und mit zunehmenden Pflanzenalter weiter abnahmen, sodass nach etwa sechs Wochen kein CYP2A6 Protein mehr detektiert werden konnte. Die Gründe hierfür sind auf eine generell schwache RNA-Synthese als auch auf die Instabilität der mRNA zurückzuführen. Fütterungsexperimente zeigten jedoch, dass das gebildete humane Cytochrom in der Lage ist, bereitgestelltes Indol zu hydroxylieren. Da keine zusätzliche Expression einer NADPH-Reduktase erfolgte, werden die für die Aktivität des Cytochroms benötigten Reduktionsäquivalente durch noch nicht bekannte andere Mechanismen bereitgestellt.

Die Optimierung des Expressionssystems durch Verwendung einer Kodon-optimierten CYP2A6-Sequenz sowie durch Verwendung eines konstitutiven Promotors führte zwar zu größeren Mengen an stabiler RNA, jedoch zu keiner gesteigerten Proteinsynthese. Im Gegenteil, es konnte zu keiner Zeit Protein detektiert werden, was wahrscheinlich auf eine falsche Faltung des Proteins und einen daraus resultierenden frühzeitigen Proteinabbau zurückzuführen ist. Trotzdem konnte auch hier die Bildung geringer Mengen Indican nachgewiesen werden. Abschließend kann gesagt werden, dass auch die Expression von CYP2A6 im Chloroplastengenom nicht zur Änderung des Phänotyps der Pflanze durch

Bildung von Indigo führt und in diesem Fall die geringe Expression als auch die Glykosylierung von Indoxyl limitierende Faktoren für das gezielte Metabolic Engineering darstellen.

Da über Chloroplasten-lokalisierte NADPH-Reduktasen bisher nichts bekannt ist, wurde die NADPH-Reduktase ATR2 aus *Arabidopsis thaliana* näher charakterisiert. Dabei waren zwei Sequenzmerkmale von besonderem Interesse. Das ist zum einen die N-terminale Signalsequenz, die eine Lokalisation des Proteins in den Chloroplasten vorhersagen lässt, zum anderen das Vorkommen einer Lipobox, die als typisches bakterielles Lipidierungssignal bekannt ist. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass bei Expression des Reduktase-Gens in Bakterien der N-Terminus erkannt wird und dies zur Lipidierung des Proteins führt. Ebenso führt eine Mutation des essenziellen Cystein innerhalb der Lipobox nicht zur Lipidierung des Proteins. Weiter konnte dargelegt werden, dass die Signalsequenz bei Expression in Pflanzen nicht als Lipidierungssignal erkannt wird und somit keine Lipidierung erfolgt, unabhängig von der Mutation als auch unabhängig vom Fehlen des N-Terminus. Abschließend kann außerdem die wichtigste Aussage getroffen werden, dass ATR2 anders als bisher vermutet, nicht im Chloroplasten lokalisiert ist.

7. Summary

Cytochrome-P450-enzymes as versatile biocatalysts are promising tools for specific metabolic engineering. Thus, it opens up many new possibilities for targeted intervention in the plant secondary metabolism, especially with regard to the generation of new pharmacologically active substances in medicinal plants. The observation, that recombinant *E. coli* cultures expressing the human cytochrome CYP2A6 were able to hydroxylate endogenous indole, which leads to the formation of indigo, raised the question whether an intervention in the secondary metabolism of tobacco plants also can cause the formation of indigo. It was demonstrated in previous work that the expression of CYP2A6 in the nucleus does not lead to the formation of indigo, but only to the synthesis of the glycoside indican. Since the expression levels were rather low and not stable, it should be evaluated, whether the integration of the CYP2A6-cDNA into the chloroplast genome results in an increased expression and also leads to a higher accumulation rate of the metabolites. It should also be investigated, if the direct formation of indigo is possible, due to the putative absence of glycosyltransferases in the chloroplasts.

In the present study it was shown, that the expression of human CYP2A6 from the chloroplast genome using the vectors pNT2 and pRB95 and the promotor *psbA* is generally possible. It turned out, that the expression levels in transplastomic plants were very low and decreased with an increasing plant age. No CYP2A6 protein could be detected after about six weeks. The reason can be seen in a generally weak RNA synthesis as well as in the instability of the mRNA. Feeding experiments showed that the synthesized human cytochrome is able to hydroxylate the provided indole. Since no additional reductase was expressed, mechanisms providing the reduction equivalents required for the activity of the cytochrome are still unknown.

The optimization of the expression system with the help of a codon optimized CYP2A6 sequence and of a constitutive promoter, indeed, led to larger amounts of stable RNA. However, no increase in protein synthesis could be detected. This might be due to an incorrect folding of the protein and a consequential premature protein degradation. Nevertheless, the formation of small amounts of indican could be detected and assigned to little amounts of active protein. In conclusion, the expression of CYP2A6 within the chloroplast genome did not lead to phenotypic changes of the tobacco plant forming indigo. In this case, the low expression and also the glycosylation of indoxyl are limiting factors for the targeted metabolic engineering.

As chloroplast localized NADPH-reductases have not been studied so far, the NADPH-reductase ATR2 from *Arabidopsis thaliana* was characterized in detail. Here, two sequence features were of particular interest. Firstly, the N-terminal signal sequence which predicts a localization of the protein within the chloroplast, and secondly the occurrence of a Lipobox which is known as a typical bacterial lipidation signal. It could be shown that during expression of the reductase gene in bacterial cells the N-terminus is recognized and this leads to the lipidation of the protein. A mutation of the essential cysteine within the Lipobox abolishes lipidation of the protein as well. Furthermore, it could be demonstrated that this signal sequence does not act as a lipidation signal when expressed in plants and thus no lipidation occurs, independent of the mutation and also independent of the absence of the N-terminus. Most important, it could be shown that the protein is not located within the chloroplast.

8. Literaturverzeichnis

Adam, Z. (2000): Chloroplast proteases: Possible regulators of gene expression? *Biochimie* 82: 647 – 654

Allen, G.C., Hall, G., Michalowski, S., Newman, W., Spiker, S., Weissinger, A.K., Thompson, W.F. (1996): High-Level Transgene Expression in Plant Cells: Effects of a Strong Scaffold Attachment Region from Tobacco. *The Plant Cell* 8: 899 – 913

Amberg, D. (2002): Isolation of Yeast Genomic DNA. www.upstate.edu/biochem/amberg/protocols/yeast_genomic_DNA.html

Angelini, L.G., Tozzi, S., Nassi o Di Nasso, N. (2004): Environmental factors affecting productivity, indican content, and indigo yield in *Polygonum tinctorium* Ait., a subtropical crop grown under temperate conditions. *J Agric Food Chem.* 52 (25): 7541 – 7547

Angov, E. (2011): Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol J.* 6 (6): 650 – 659

Apel, W., Schulze, W.X., Bock, R. (2010): Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *The Plant Journal* 63: 636 – 650

Arlen, P.A., Falconer, R., Cherukumilli, S., Cole, A., Cole, A.M., Oishi, K.K., Daniell, H. (2007): Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon- α 2b. *Plant Biotechnology Journal* 5: 511 – 525

Austin, S., Bingham, E.T., Koegel, R.G., Mathews, D.E., Shahan, M.N., Straub, R.J., Burges, R.R. (1994): An overview of a feasibility study for the production of industrial enzymes in transgenic alfalfa. *Ann N Y Acad Sci.* 721: 234 - 244

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidmann, J.G., Struhl, K. (1994): Current Protocols in Molecular Biology. Greene and Wiley, New York

Babu, M.M., Sankaran, K. (2002): DOLOP-database of bacterial lipoproteins. *Bioinformatics* 18: 641 – 643

Bak, S., Nielsen, H.L., Halkier, B.A. (1998): The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants shows evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides and glucosinolates. *Plant Molecular Biology* 38: 725 – 734

Barnes, H.J. (1996): Maximizing Expression of Eukaryotic Cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 272: 3 – 14

Barnes, H.J., Arlotto, M.P., Waterman, M.R. (1991): Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5597 – 5601

Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. (1992): New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* 20: 1195 – 1197

Bell-Lelong, D.A., Cusumano, J.C., Meyer, K., Chapple, C. (1997): Cinnamate-4-Hydroxylase Expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 113: 729 – 738

Bellucci, M., De Marchis, F., Mannucci, R., Bock, R., Arcioni, S. (2005): Cytoplasm and chloroplasts are not suitable subcellular locations for β -zein accumulation in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 56 (414): 1205 – 1212

Benveniste, I., Lesot, A., Hasenfratz, M.-P., Kochs, G., Durst, F. (1991): Multiple Forms of NADPH-Cytochrome P450 Reductase in Higher Plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 177 (1): 105 – 112

Bernhardt, R. (2006): Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology* 124: 128 – 145

Berry, A., Dodge, T.C., Pepsin, M., Weyler W. (2002): Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28: 127 – 133.

Birch-Machin, I., Newell, C.A., Hibberd, J.M., Gray, J.C. (2004): Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. *Plant Biotechnology Journal* 2: 261 – 270

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513 – 1523

Black, S.D., Coon, M.J. (1982): Structural features of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. Hydrophobic domain, hydrophilic domain, and connecting region. *J Biol Chem.* 257 (10): 5929 – 5938

Bock, R. (2001): Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology. *J. Mol. Biol.* 312: 425 – 438

Bock, R. (2007): Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 100 – 106

Bordier, C. (1980): Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (4): 1604 – 1607

Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C. (1988): Chloroplast Transformation in *Chlamydomonas* with High Velocity Microprojectiles. *Science* 240 (4858): 1534 – 1538

Brandizzi, F., Fricker, M., Hawes, C. (2002): A Greener World: The Revolution in Plant Bioimaging. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3 (7): 520 – 530

Burd, V.N., Bantleon, R., van Pee, K.-H. (2001): Oxidation of Indole and Indole Derivatives Catalyzed by Nonheme Chloroperoxidases. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37 (3): 248 - 250

Chefson, A., Auclair, K. (2006): Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol. BioSyst.* 2: 462 – 469

Chapple, C. (1998): Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450 dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 311 – 343

Cheng, J., Wan, D., Gu, J., Gong, Y., Yang, S., Hao, D., Yang, L. (2006): Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: Application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s *in vitro*. *Protein Expression and Purification* 47: 467 – 476

Chomczynski, P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532 – 7

Comai, L., Moran, P., Maslyar, D. (1990): Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements. *Plant Mol Biol.* 15 (3): 373 – 381

Davis, K.M. (2004): Plant Pigments and Their Manipulation. *Annual Plant Reviews* 14.

Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I. (2005): Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* 105: 2253 – 2277

Denton, T.T., Zhang, X., Cashman, J.R. (2004): Nicotine-related alkaloids and metabolites as inhibitors of human cytochrome P-450 2A6. *Biochemical Pharmacology* 67: 751 – 756

Dueckershoff, K., Unger, M., Frank, A., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., Warzecha, H. (2005): Modified nicotine metabolism in transgenic tobacco plants expressing the human cytochrome P450 2A6 cDNA. *FEBS Letters* 579: 2480 – 2484

Ensley, B.D., Ratzkin, B.J., Osslund, T.D., Simon, M.J., Wackett, L.P., Gibson, D.T. (1983): Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* 222 (4620): 167 – 9

Fisher, C.W., Shet, M.S., Estabrook, R.W. (1996): Construction of Plasmids and Expression in *Escherichia coli* of Enzymatically Active Fusion Proteins Containing the Heme-Domain of a P450 Linked to NADPH-P450 Reductase. *Methods in Enzymology* 272, 13 – 20.

Frey, M., Stettner, C., Pare, P.W., Schmelz, E.A., Tumlinson, J.H., Gierl, A. (2000): An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *PNAS* 97: 14801 – 14806

Froehlich, J.E., Itoh, A., Howe, G.A. (2001): Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiology* 125: 306 – 317

Fujita, K., Kamataki, T. (2002): Genetically Engineered Bacterial Cells Co-expressing Human Cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 Reductase: Prediction of Metabolism and Toxicity of Drugs in Humans. *Drug. Metabol. Pharmacokin.* 17 (1): 1 – 22

Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., Saindrenan, P. (2005): Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10 (11): 542 – 549

Garbarino, J.E., Oosumi, T., Belknap, W.R. (1995): Isolation of a Polyubiquitin Promoter and Its expression in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiol.* 109: 1371 – 1378

Garfinkel, D. (1958): Studies on pig liver microsomes. I Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77: 493 – 509

Gierl, A., Frey, M. (2001): Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* 213 (4): 493 – 498

Giglione, C., Vallon, O., Meinel, T. (2003): Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *The EMBO Journal* 22 (1): 13 – 23

Gilbert, K.G., Cooke, D.T. (2001): Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential. *Plant Growth Regulation* 34: 57 – 69

Gillam, E.M.J., Aguinaldo, A.M.A., Notley, L.M., Kim, D., Mundkowski, R.G., Volkov, A.A., Arnold, F.H., Soucek, P., DeVoss, J.J., Guengerich, F.P. (1999): Formation of Indigo by Recombinant Mammalian Cytochrome P450 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265: 469 – 472

Gillam, E.M.J., Notley, L.M., Cai, H., DeVoss, J.J., Guengerich, F.P. (2000): Oxidation of Indole by Cytochrome P450 Enzymes. *Biochemistry* 39: 13817 – 13824

Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P. (2001): Exploiting the Versatility of Human Cytochrome P450 Enzymes: The Promise of Blue Roses From Biotechnology. *Life* 52: 271 – 277

Gillam, E.M.J. (2005): Exploring the Potential of Xenobiotic-Metabolising Enzymes as Biocatalysts: Evolving Designer Catalysts from Polyfunctional Cytochrome P450 Enzymes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 32: 147 – 152

Glenz, K., Bouchon, B., Stehle, T., Wallich, R., Simon, M.M., Warzecha, H. (2006): A recombinant bacterial lipoprotein vaccine from higher plant chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* 24: 76 – 77

Green, P.J. (1993): Control of mRNA Stability in Higher Plants. *Plant Physiol.* 102: 1065 – 1070

Guengerich, F.P., Martin, M.V., Guo, Z., Chun, Y.-J. (1996): Purification of Functional Recombinant P450s from Bacteria. *Methods In Enzymology* 272: 35 – 44

Guengerich, F.P., Hosea, N.A., Parikh, A., Bell-Parikh, L.C., Johnson, W.W., Gillam, E.M.J., Shimada, T. (1998): Twenty Years of Biochemistry of Human P450s: Purification, Expression, Mechanism, and Relevance to Drugs. *Drug Metabolism And Disposition* 26: 1175 – 1178

Guengerich, F.P. (2002): Cytochrome P450 Enzymes in the Generation of Commercial Products. *Nature* 1: 359 – 366

Guengerich, F.P. (2003): Cytochrome P450, Drugs, and Diseases. *Molecular Interventions* 3: 194 – 204

Häkkinen, S.T., Tilleman, S., Swiatek, A., De Sutter, V., Rischer, H., Vanhoutte, I., Van Onckelen, H., Hilson, P., Inze, D., Oksman-Caldentey, K.-M., Goossens, A. (2007): Functional characterisation of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. *Phytochemistry* 68: 2773 – 2785

Halkier, B.A., Nielsen, H.L., Koch, B., Moller, B.L. (1995): Purification and characterization of recombinant cytochrome P450TYR expressed at high levels in Escherichia coli. *Arch Biochem Biophys.* 322 (2): 369 – 377

Hanton, S.L., Brandizzi, F. (2006): Fluorescent Proteins As Markers in the Plant Secretors Pathway. *Microsc Res Tech.* 69 (3): 152 – 159

Harper B.K., Mabon S.A., Leffel S.M., Halfhill M.D., Richards H.A., Moyer K.A., Stewart C.N. (1999): Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 17: 1125 – 1129

Harris, F., Brandenburg, K., Seydel, U., Phoenix, D. (2002): Investigations into the mechanisms used by the C-terminal anchors of *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction. *Eur. J. Biochem.* 269: 5821 – 5829

Hayashi, S., Wu, H.C. (1990): Lipoproteins in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 22: 451 – 471

Hecht, S.S., Hochalter, J.B., Villalta, P.W., Murphy, S.E. (2000): 2'-Hydroxylation of nicotine by cytochrome P450 2A6 and human liver microsomes: Formation of a lung carcinogen precursor. *Proc Natl Acad Sci* 97 (23): 12493 – 12497

Higgs, D.C., Shapiro, R.S., Kindle, K.L., Stern, D.B. (1999): Small *cis*-acting Sequences That Specify Secondary Structures in a Chloroplast mRNA are Essential for RNA Stability and Translation. *Mol. Cell. Biol.* 19 (12): 8479 – 8491

Holton, T.A., Brugliera, F., Lester, D.R., Tanaka, Y., Hyland, C.D., Menting, J.G., Lu, C.Y., Farcy, E., Stevenson, T.W., Cornish, E.C. (1993): Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366 (6452): 276 – 279

Horn, M.E., Woodard, S.L., Howard, J.A. (2004): Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep* 22: 711 – 720

Hukkanen, J. (2000): Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung. *Oulu University Library* (<http://herkules.oulu.fi>)

Hukkanen, J., Jacob III, P., Peng, M., Dempsey, D., Benowitz, N.L. (2010): Effects of nicotine on cytochrome P450 2A6 and 2E1 activities. *Br J Clin Pharmacol.* 69 (2): 152 – 159

Hull, A.K., Celenza, J.L. (2000): Bacterial Expression and Purification of the *Arabidopsis* NADPH-Cytochrome P450 Reductase ATR2. *Protein Expression and Purification* 18: 310 – 315

Hull, A.K., Vij, R., Celenza, J.L. (2000): *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 97 (5): 2379 – 2384

- Hyunjong, B., Lee, D.-S., Hwang, I.** (2006): Dual targeting of xylanase to chloroplasts and peroxisomes as a means to increase protein accumulation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 57 (1): 161 – 169
- Ilan, Z., Cinti, D.L.** (1981): Evidence for a New Physiological Role of Hepatic NADPH:Ferricytochrome (P-450) Oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (19): 10066 – 10072
- Inui, H., Ohkawa, H.** (2005): Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. *Pest Manag Sci* 61: 286 – 291
- Iwahashi, K., Waga, C., Takimoto, T.** (2004): Whole Deletion of CYP2A6 Gene (CYP2A6*4C) and Smoking Behavior. *Neuropsychobiology* 49: 101 – 104
- Jensen, K., Moller, B.L.** (2010): Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71: 132 – 141
- Jensen, K., Jensen, P.E., Moller, B.L.** (2011): Light-driven Cytochrome P450 Hydroxylations. *ACS Chem. Biol.* 6 (6): 533 – 539
- Jiang, H., Morgan, J.A.** (2004): Optimization of an In Vivo Plant P450 Monooxygenase System in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 85: 130 – 137
- Kamataki, T., Nunoya, K., Sakai, Y., Kushida, H., Fujita, K.** (1999): Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. *Mutation Research* 428 (1-2): 125 – 130
- Kapoor, S., Suzuki, J.Y., Sugiura, M.** (1997): Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *The Plant Journal* 11 (2): 327 – 337
- Khandelia, H., Ipsen, J.H., Mouritsen, O.G.** (2008): The impact of peptides on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778 (7-8): 1528 – 1536
- Kim, J.Y., Lee, K., Kim, Y., Kim, C.-K., Lee, K.** (2003): Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Letters in Applied Microbiology* 36: 343 – 348

Klein, T.M., Harper, E.C., Svab, Z., Sanford, J.C., Fromm, M.E., Maliga, P. (1988): Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8502 – 8505

Kokubun, T., Edmonds, J., John, P. (1998): Indoxyl Derivatives in Woad in Relation to Medieval Indigo Production. *Phytochemistry* 49 (1): 79 – 87

Kulik, V., Hartmann, E., Weyand, M., Frey, M., Gierl, A., Niks, D., Dunn, M.F., Schlichting, I. (2005): On the structural basis of the catalytic mechanism and the regulation of the alpha subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium* and BX1 from maize, two evolutionarily related enzymes. *J. Mol. Biol.* 352: 608 – 620

Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L., Howard, J.A. (1997): Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 56 (5): 473 – 484

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Le Gal, A., Dreano, Y., Lucas, D., Berthou, F. (2003): Diversity of selective environmental substrates for human cytochrome P450 2A6: alkoxyethers, nicotine, coumarin, N-nitrosodiethylamine, and N-nitrosobenzylmethylamine. *Toxicology Letters* 144: 77 – 91

Leake, H. (1975): An Historical Memoir of the Indigo Industry of Bihar.

Lewis, D.F.V. (2001): Guide to Cytochromes P450: Structure and Function. *CRC Press*

Louerat-Oriou, B., Perret, A., Pompon, D. (1998): Differential redox and electron-transfer properties of purified yeast, plant and human NADPH-cytochrome P-450 reductases highly modulate cytochrome P-450 activities. *Eur. J. Biochem.* 258: 1040 – 1049

Lu, A.Y.H., Junk, K.W., Coon, M.J. (1969): Resolution of the Cytochrome P-450-containing ω -Hydroxylation System of Liver Microsomes into Three Components. *The Journal of Biological Chemistry* 244 (13): 3714 – 3721

Ma, J.K.-C., Drake, P.M.W., Christou, P. (2003): The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. *Nat Rev Genet.* 4 (10): 794 – 805

Magee, A.M., Horvath, E.M., Kavanagh, T.A. (2004): Pre-screening plastid transgene expression cassettes in *Escherichia coli* may be unreliable as a predictor of expression levels in chloroplast transformed plants. *Plant Science* 166: 1605 – 1611

Maliga, P. (2002): Engineering the plastid genome of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 164 – 172

Maliga, P. (2003): Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology* 21 (1): 20 – 28

Maliga, P. (2004): Plastid Transformation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 289 – 313

Maniatis, Sambrook & Fritsch: Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marillonet S., Giritch A., Gils M., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. (2004): *In planta* engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *PNAS* 101: 6852 – 6857

Marillonet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. (2005): Systemic *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology*. 23: 718-723

Mattanovich, D., Rüker, F., Machado, A., Laimer, M., Regner, F., Steinkellner, H., Himmler, G., Katinger, H. (1989): Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6747

Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P., Legoy, M.D. (2001): Identification of an precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). *Phytochemistry* 58: 897 – 904

Maugard, T., Enaud, E., Sayette, A., Choisy, P., Legoy, M.D. (2002): β -Glucosidase-Catalyzed Hydrolysis of Indican from Leaves of *Polygonum tinctorium*. *Biotechnol. Prog.* 18: 1104 – 1108

- McGabe, M.S., Klaas, M., Gonzalez-Rabade, N., Poage, M., Badillo-Corona, J.A., Zhou, F., Karcher, D., Bock, R., Gray, J.C., Dix, P.J.** (2008): Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnology Journal* 6: 914 – 929
- Millan, A.F.-S., Farran, I., Molina, A., Mingo-Castel, A.M., Veramendi, J.** (2007): Expression of recombinant proteins lacking methionine as N-terminal amino acid in plastids: human serum albumin as a case study. *J Biotechnol.* 127 (4): 593 – 604
- Minami, Y., Nishimura, O., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H.** (2000): Tissue and Intracellular Localization of Indican and the Purification and Characterization of Indican Synthase from Indigo Plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 218 – 225
- Mizutani, M., Ohta, D., Sato, R.** (1997): Isolation of a cDNA and a Genomic Clone Encoding Cinnamate 4-Hydroxylase from Arabidopsis and Its Expression Manner in Planta. *Plant Physiol.* 113: 755 – 763
- Mizutani, M., Ohta, D.** (1998): Two Isoforms of NADPH:Cytochrome P450 Reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 357 – 367
- Monde, R.-A., Greene, J.C., Stern, D.B.** (2000): The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 3'-end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. *Plant Molecular Biology* 44: 529 – 542
- Monier, S., van Luc, P., Kreibich, G., Sabatini, D.D., Adesnik, M.** (1988): Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol.* 107 (2): 457 – 470
- Morant, M., Bak, S., Moller, B.L., Werck-Reichhart, D.** (2003): Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 151 – 162
- Murdoch, D., Ensley, B.D., Serdar, C., Thalen, M.** (1993): Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 11: 381 – 386

- Nakamura, K., Martin, M.V., Guengerich, F.P.** (2001): Random Mutagenesis of Human Cytochrome P450 2A6 and Screening with Indole Oxidation Products. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 395: 25 – 31
- Nakatsuka, T., Abe, Y., Kakizaki, Y., Yamamura, S., Nishihara, M.** (2007): Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 26 (11): 1951 – 1959
- Nebert, D.W., Russell, D.W.** (2002): Clinical importance of the Cytochromes P450. *Lancet.* 360 (9340): 1155 - 1162
- Newton, D.L., Boque, L., Wlodawer, A., Huang, C.Y., Rybak, S.M.** (1998): Single amino acid substitutions at the N-terminus of a recombinant cytotoxic ribonuclease markedly influence biochemical and biological properties. *Biochemistry* 37: 5173 – 5183
- Oberthür, C., Graf, H., Hamburger, M.** (2004): The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves – a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments. *Phytochemistry* 65: 3261 – 3268
- Omura, T., Sato, R.** (1964): The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem.* 239: 2370 – 2380
- Parikh, A., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P.** (1997): Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nature Biotechnology* 15: 784 – 788
- Pelkonen, O., Rautio, A., Raunio, H., Pasanen, M.** (2000): CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144: 139 – 147
- Pernecky, S.J., Coon, M.J.** (1996): N-Terminal Modifications That Alter P450 Membrane Targeting and Function. *Methods in Enzymology* 272: 25 – 34.
- Portal, P., Villamil, S.F., Alonso, G.D., De Vas, M.G., Flawia, M.M., Torres, H.N., Paveto, C.** (2008): Multiple NADPH-cytochrome P450 reductases from *Trypanosoma cruzi* Suggested role on drug resistance. *Molecular & Biochemical Parasitology* 160: 42 – 51
- Poulos, T.L.** (1988): Cytochrome P450: Molecular Architecture, Mechanism, and Prospects for Rational Inhibitor Design. *Pharmaceutical Research* 5: 67 – 75

Pratt, J.M., Jackson, M.E., Holland, I.B. (1986): The C terminus of penicillin-binding protein 5 is essential for localisation to the E. coli inner membrane. *EMBO J.* 5 (9): 2399 – 2405

Preußner, A. (2011): Expressionsmuster und Funktionalität humaner P450-Monooxygenasen in Transgenpflanzen. *Bachelorarbeit*, TU Darmstadt

Quesada-Vargas, T., Ruiz, O.N., Daniell, H. (2005): Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, and translation. *Plant Physiol.* 138 (3): 1746 – 1762

Radwanski, E.R., Last, R.L. (1995): Tryptophan Biosynthesis and Metabolism: Biochemical and Molecular Genetics. *The Plant Cell* 7: 921 – 934

Raunio, H., Rautio, A., Gullsten, H., Pelkonen, O. (2001): Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol.* 52 (4): 357 – 363

Ro, D.-K., Ehlting, J., Douglas, C.J. (2002): Cloning, Functional Expression, and Subcellular Localization of Multiple NADPH-Cytochrome P450 Reductases from Hybrid Poplar. *Plant Physiology* 130: 1837 – 1851

Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J.S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M., Humphreys, G. (1984): Codon usage can affect efficiency of translation of genes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 12: 6663 – 6671

Ross, J., Li, Y., Lim, E.-K., Bowles, D.J. (2001): Higher Plant Glycosyltransferases. *Genome Biol.* 2 (2): 3004.1 – 3004.6

Royo, J.L., Moreno-Ruiz, E., Cebolla, A., Santero, E. (2005): Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit. *Journal of Biotechnology* 116: 113 – 124

Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N. (1987): Delivery of substances into cells and tissue using particle bombardement process. *Part. Sci. Technol.* 5: 27 – 37

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463 – 5467

Sankaran, K., Wu, H.C. (1994): Lipid Modification of Bacterial Prolipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (31): 19701 – 19706

Sansen, S., Hsu, M.-H., Stout, C.D., Johnson, E.F. (2007): Structural insight into the altered substrate specificity of human cytochrome P450 2A6 mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464: 197 – 206

Song, W.-C., Brash, A.R. (1991): Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science* 253 (5021): 781 – 784

Stern, D.B., Jones, H., Gruissem, W. (1989): Function of plastid mRNA 3' inverted repeats. RNA stabilization and gene-specific protein binding. *J Biol Chem.* 264 (31): 18742 – 18750

Streatfield, S.J. (2007): Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnology Journal* 5: 2 – 15

Sugita, M., Sugiura, M. (1996): Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Molecular Biology* 32: 315 – 326

Svab, Z., Hajdukiewicz, P., Mailga, P. (1990): Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87: 8526 – 8530

Szczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C.D., Doray, B., Kemper, B. (1995): The cytoplasmic and N-terminal transmembrane domains of cytochrome P450 contain independent signals for retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 270 (41): 24327 – 24333

Taavitsainen, P., Juvonen, R., Pelkonen, O. (2001): In vitro inhibition of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes by a potent CYP2A6 inhibitor, *trans*-2-phenylcyclopropylamine (Tranlylcypromine), and its nonamine analog, Cyclopropylbenzene. *Drug Metabolism and Disposition* 29 (3): 217 – 222

Tiong, K.H., Yiap, B.C., Tan, E.L., Ismail, R., Ong, C.E. (2010): Functional Characterization of Cytochrome P450 2A6 Allelic Variants *CYP2A6*15*, *CYP2A6*16*, *CYP2A6*21*, and *CYP2A6*22*. *Drug Metabolism and Disposition* 38 (5): 745 – 751

Tregoning, J.S., Nixon, P., Kuroda, H., Svab, Z., Clare, S., Bowe, F., Fairweather, N., Ytterberg, J., van Wijk, K.J., Dougan, G., Maliga, P. (2003): Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Research* 31 (4): 1174 – 1179

Tzfira T., Citovsky V. (2006): Agrobacterium-mediated transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 17(2): 147 – 154

Urban, P., Cullin, C., Pompon, D. (1990): Maximizing the expression of mammalian cytochrome P-450 monooxygenase activities in yeast-cells. *Biochimie* 72(6-7): 463 – 472

Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D. (1997): Cloning, Yeast Expression, and Characterization of the Coupling of Two Distantly Related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 Reductases with P450 CYP73A5. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (31): 19176 – 19186

Urbank, S. (2006): Untersuchungen zur Identifizierung von Genen der Indicanbiosynthese in Färbepflanzen. *Diplomarbeit*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Van Rooijen, G.C., Moloney, M.M. (1995): Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Biotechnology (NY)* 13 (1): 72 – 77

Von Heijne, G., Steppuhn, J., Herrmann, R.G. (1989): Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J. Biochem.* 180 (3): 535 – 545

Varshavsky, A. (1996): The N-end rule: function, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (22): 12142 – 12149

Verma D., Samson N.P., Koya V., Daniell H. (2008): A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nat Protoc.* 3(4): 739 – 758

Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V., Coon, M.J. (1981): Separate Roles for FMN and FAD in Catalysis by Liver Microsomal NADPH-cytochrome P-450 Reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (1): 266 – 277

Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M. (2006): A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 27: 2782-2786

- Warzecha, H., Frank, A., Peer, M., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., Unger, M.** (2007): Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures. *Plant Biotech.Journal* 5: 185 – 191
- Watson, C.J.W., Froehlich, J.E., Josefsson, C.A., Chapple, C., Durst, F., Benveniste, I., Coolbaugh, R.C.** (2001): Localization of CYP86B1 in the Outer Envelope of Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 44 (8): 873 – 878
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., Didierjean, L.** (2000): Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends in Plant Science* 5: 116 – 123
- Werck-Reichhart, D., Bak, S., Paquette, S.** (2002): Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book*, 1 – 28
- Williams, J.A., Ring, B.J., Cantrell, V.E., Jones, D.R., Eckstein, J., Ruterbories, K., Hamman, M.A., Hall, S.D., Wrighton, S.A.** (2003): Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 30 (8): 883 – 891
- Wu, E., Komolpis, K., Wang, H.Y.** (1999): Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. *Biotechnology Techniques* 13: 567 – 569
- Xia, Z.-Q., Zenk, M.H.** (1992): Biosynthesis of Indigo Precursors in higher Plants. *Phytochemistry* 31: 2695 – 2697
- Yamazaki, S., Sato, K., Suhara, K., Sakaguchi, M., Mihara, K., Omura, T.** (1993): Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *J Biochem.* 114 (5): 652 – 657
- Yang, C.-Q., Lu, S., Mao, Y.-B., Wang, L.-J., Chen, X.-Y.** (2009): Characterization of two NADPH: Cytochrome P450 reductases from cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry* 71 (1): 27 – 35
- Yang, D., Wu, L., Hwang, J.-S., Chen, L., Huang, N** (2001): Expression of the REB transcriptional activator in rice grains improves the yield of recombinant proteins whose genes are controlled by a *Reb*-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98: 11438 – 11443

Yang, X., Zhang, B., Molony, C., Chudin, E., Hao, K., Zhu, J., Gaedigk, A., Suver, C., Zhong, H., Leeder, J.S., Guengerich, F.P., Strom, S.C., Schuetz, E., Rushmore, T.H., Ulrich, R.G., Slatter, J.G., Schadt, E.E., Kasarskis, A., Lum, P.Y. (2010): Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Res.* 20 (8): 1020 – 1036

9. Anhang

9.1 Vollständige Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine

```

MLASGMLLVALLVCLTVMVLMSVWQQRKSKGKLPPGPTPLPFIGNYLQLNTEQMYSNLMKISERYGP
VFTIHLGPRRVVLCGHDAVREALVDQAEESGRGEQATFDWVFKGYGVVFSNGERAKQLRRFSIAT
LRDFGVGKRGIEERIQQEAGFLIDALRGTTGGANIDPTFFLSRTVSNVISSIVFGDRFDYKDKEFLSL
LRMMLGIFQFTSTSTGQLYEMFSSVMKHLPGPQQQAFQLQGLEDFIAKKVEHNQRTLDPNSPRDFI
DSFLIRMQEEKNPNTEFYLNLMVTTLNLFIGGTETVSTTLRYGFLLMKHPEVEAKVHEEIDRVI
GKNRQPKFEDRAKMPYMEAVIHEIQRFQDVIPMSLARRVKKDTKFRDFFLPKGTEVFPMLGSVLRDP
SFFSNPQDFNPQHFLNEKGQFKKSDAFVPSIGKRNCFGEGGLARMELFLFFTTVMQNFRLKSSQSPK
DIDVSPKHVGFATIPRNYTMSFLPR*

```

Abb. 9.1. Aminosäuresequenz des humanen Cytochrom P450 Enzyms CYP2A6. Das für eine Expression im Vektor pNT2 verwendete Transgen unterscheidet sich vom endogenen CYP2A6 lediglich durch den Austausch der zweiten Aminosäure zu Alanin

```

MAASGMLLVALLVCLTVMVLMSVWQQRKSKGKLPPGPTPLPFIGNYLQLNTEQMYSNLMKISERYGP
VFTIHLGPRRVVLCGHDAVREALVDQAEESGRGEQATFDWVFKGYGVVFSNGERAKQLRRFSIAT
LRDFGVGKRGIEERIQQEAGFLIDALRGTTGGANIDPTFFLSRTVSNVISSIVFGDRFDYKDKEFLSL
LRMMLGIFQFTSTSTGQLYEMFSSVMKHLPGPQQQAFQLCQGLEDFIAKKVEHNQRTLDPNSPRDFI
DSFLIRMQEEKNPNTEFYLNLMVTTLQLFIGGTETVSTTLRYGFLLMKHPEVEAKVHEEIDRVI
GKNRQPKFEDRAKMPYMEAVIHEIQRFQDVIPMSLARRVKKDTKFRDFFLPKGTEVYPMLGSVLRDP
SFFSNPQDFNPQHFLNEKGQFKKSDAFVPSIGKRNCFGEGGLARMELFLFFTTVMQNFRLKSSQSPK
DIDVSPKHVGFATIPRNYTMSFLPRHHHHH*

```

Abb. 9.2. Aminosäuresequenz des mutierten CYP2A6bchis. Das für eine Expression im Vektor pRB95 verwendete CYP2A6bchis ist durch den Austausch zweier Aminosäuren und durch ein His-Tag gekennzeichnet.

MAHMAASGMLLVALLVCLTVMVLMVSVWQQRKSKGKLPPGPTPLPFIGNYLQLNTEQMYNSLMKISER
 YGPVFTIHLGPRRVVVLGHDVREALVDQAEEFSGRGEQATFDWVFKGYGVVFSNGERAKQLRRFS
 IATLRDFGVGKRGIEERIQEEAGFLIDALRGTTGGANIDPTFFLSRTVSNVISSIVFGDRFDYKDKEF
 LSLLRMMLGIFQFTSTSTGQLYEMFSSVMKHLPGPQQQAFQLCQGLEDFIAKKVEHNQRTLDPNSPR
 DFIDSFLIRMQEEKNPNTFEYLNKLVMTTLQLFIGGTETVSTTLRYGFLLLMKHPEVEAKVHEEID
 RVIGKNRQPKFEDRAKMPYMEAVIHEIQRFGDVIPMSLARRVKKDTKFRDFFLPKGTEVYPMLGSLV
 RDPSFFSNPQDFNPQHFLNEKGQFKKSDAFVPSIGKRNCFGEGGLARMELFLFFTTVMQNFRLLKSSQ
 SPKDIDVSPKHVGFATIPRNYTMSFLPR*

Abb. 9.3. Aminosäuresequenz des optimierten CYP2A6opt. Das für eine Expression im Vektor pKP6 verwendete CYP2A6opt wurde einer Kodonoptimierung unterzogen und ist durch drei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus gekennzeichnet.

MGDSHVDTSSTVSEAVAEVSLFSMTDMILFSLIVGLLTYWFLFRKKKEEVPEFTKIQTLTSSVRES
 SFVEKMKKTGRNIIVFYGSQTGTAEFANRLSKDAHRYGMRGMSADPEEYDLADLSSLPEIDNALVV
 FCMATYGECDPTDNAQDFYDWLQETDVDLSGVKFAVFGLGNKTYEHFNAMGKYVDKRLEQLGAQRIF
 ELGLGDDDDGNLEEDFITWREQFWPAVCEHFGVEATGEESSIRQYELVVHTDIDAAKVVMGEMGRLLS
 YENQKPPFDAKNPFLAAVTTNRKLNQGTERRHLMHLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNQLG
 KILGADLDVMSLNNLDEESNKKHPFPCPTSYRTALTYYLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEQELL
 RKMSSSSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQDCPSLRPPIDHLCCELLPRLQARYYSIASSSKVHPNSV
 HICAVVVEYETKAGRINKGVATNWLRAKEPAGENGGRALVPMFVRKSQFRLPFKATTPVIMVGPPTG
 VAPFIGFIQERAWLRQQGKEVGETLLYYGCRRSDEDYLYREELAQFHRDGALTQLNVAFSREQSHKV
 YVQHLLKQDREHLWKIEGGAHIYVCGDARNMARDVQNTFYDIVAELGAMEHAQAVDYIKKLMTKGR
 YSLDVWS*

Abb. 9.4. Aminosäuresequenz der humanen NADPH-Reduktase hNPR. Die humane NADPH-Reduktase wurde über ein bicistronisches Expressionssystem zusätzlich zum CYP2A6 exprimiert.

```

MSSSSSSSTSMIDLMAAIIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIVM
LVWRRSGSGNSKRVEPLKPLVIKPREEEIDDGRKKVTIFFGTQTGTAEGFAKALGEEAKARYEKTRFKI
VDLDDYAADDDEYEEKLKKEDVAFFFLATYGDGEPTDNAARFYKWFTEGNDRGEWLKNLKYGVFGLGNR
QYEHFNKVAKVVDDILVEQGAQRLVQVGLGDDDQCIEDDFTAWREALWPELDTILREEGDTAVATPYTA
AVLEYRVSIHDEDAKFNDITLANGNGYTVFDAQHPYKANVAVKRELHTPESDRSCIHLEFDIAGSGLT
MKLGDHVGVLCDNLSETVDEALRLLDMSPTYFSLHAEKEDGTPISSSLPPFPFPCNLRTALTRYACLL
SSPKKSALVALAAHASDPTEAERLKHLASPAGKDEYSKWVVESQRSLLLEVMAEFPSAKPPLGVFFAGVA
PRLQPRFYSSISSPKIAETRIHVTCALVYEKMPGTGRIHKGVCSTWMKNAVPEYKSEKLFLGRPIFVRQS
NFKLPDSKVPPIIMIGPGTGLAPFRGFLQERLALVESGVELGPSVLFFGCRNRRMDFIYEEELQRFVES
GALAELSVAFSREGPTKEYVQHKMMDKASDIWNMISQGAYLYVCGDAKGMARDVHRSLHTIAQEQQSMD
STKAEGFVKNLQTSGRYL RDVW*

```

Abb. 9.5. Aminosäuresequenz der NADPH-Reduktase ATR2. Die vollständige Sequenz als auch kürzere Varianten wurden für eine bakterielle Expression genutzt.

```

MASSSSSSTSMIDLMAAIIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGCIVM
LVWRRSGSGNSLE*

```

Abb. 9.6. Aminosäuresequenz des N-terminalen 5'-Bereichs der NADPH-Reduktase. Diese 5' ATR2-Variante wurde für eine bakterielle als auch transiente Expression genutzt.

```

MASSSSSSTSMIDLMAAIIKGEPIVSDPANASAYESVAAELSSMLIENRQFAMIVTTSIAVLIGGIVM
LVWRRSGSGNSVD*

```

Abb. 9.7. Aminosäuresequenz des N-terminalen 5'-Bereichs der NADPH-Reduktase. Diese mutierte 5' ATR2-Variante wurde für eine bakterielle als auch transiente Expression genutzt.

9.2 Vektorkarten CYP2A6

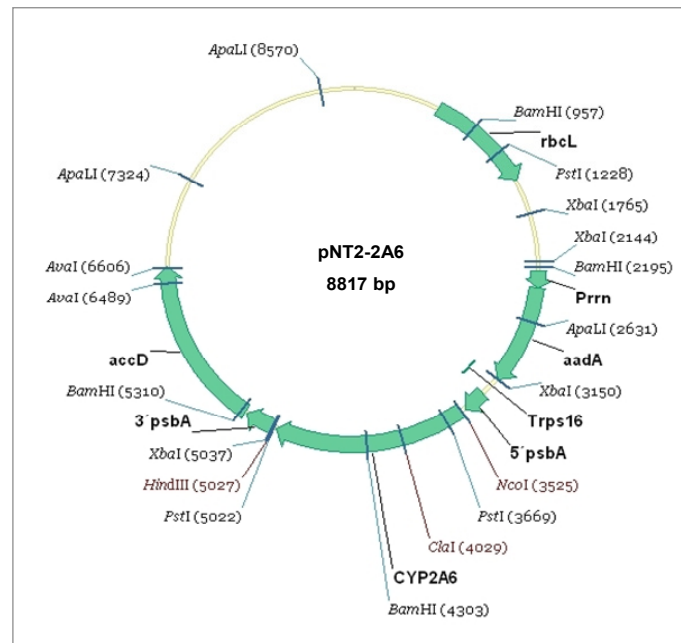


Abb. 9.8. Vektorkarte des Chloroplastenexpressionsvektor pNT2. Die Transkription des Gens *CYP2A6* wird hier durch den lichtabhängigen Promotor *psbA* reguliert.

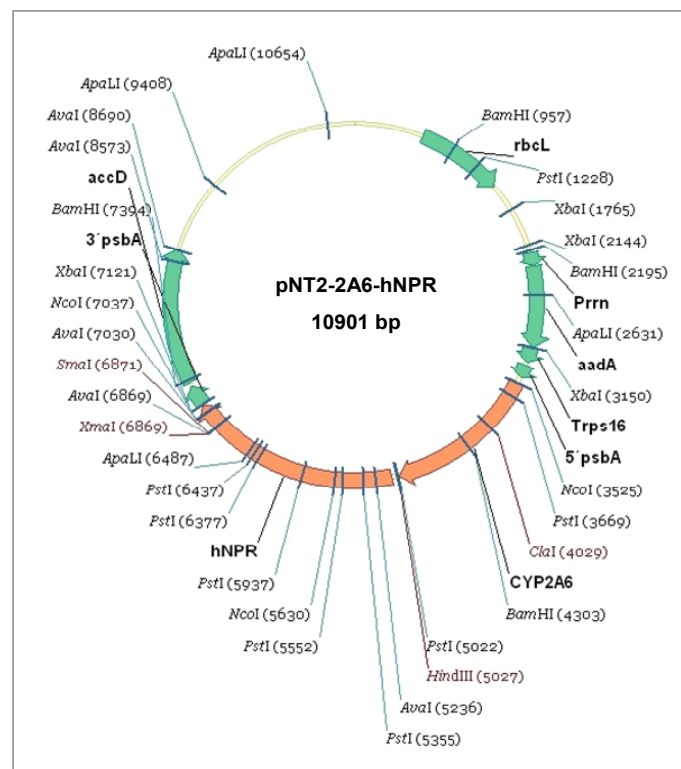


Abb. 9.9. Vektorkarte des bicistronischen Plasmids pNT2. Zusätzlich zum Transgen *CYP2A6* enthält dieser Vektor das für die humane NADPH-Reduktase kodierende Gen *hNPR*.

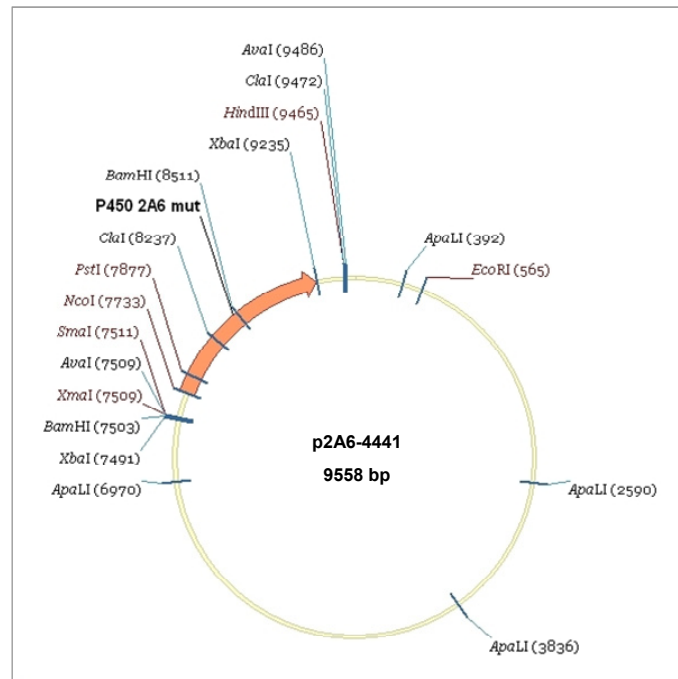


Abb. 9.10. Vektorkarte des Expressionsplasmids pRB95. Die Expression des Transgens *CYP2A6bchis* wird auch hier durch den Promotor *psbA* geregelt. Die Integration der Expressionkassette ins Chloroplastengenom erfolgt jedoch im Vergleich zum Vektor pNT2 an einer anderen Position.

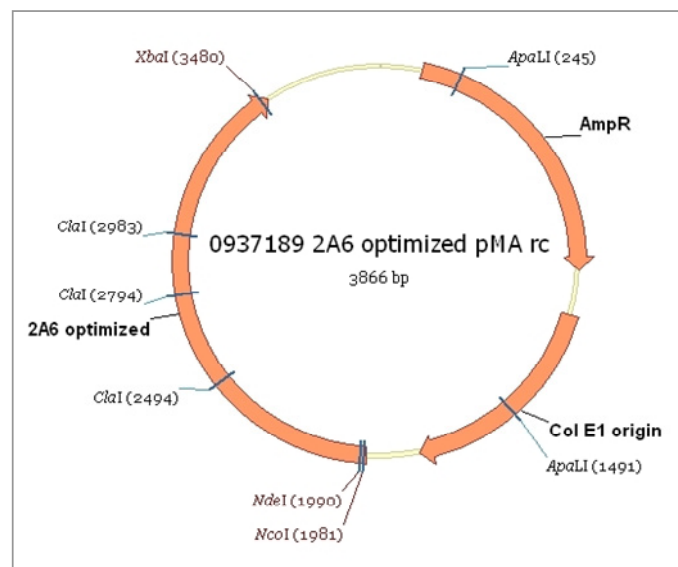


Abb. 9.11. Vektorkarte des Plasmids pMA-2A6opt. Dieser Vektor mit der Kodon-optimierten CYP2A6opt-Sequenz wurde von der Firma Mr. Gene bezogen.

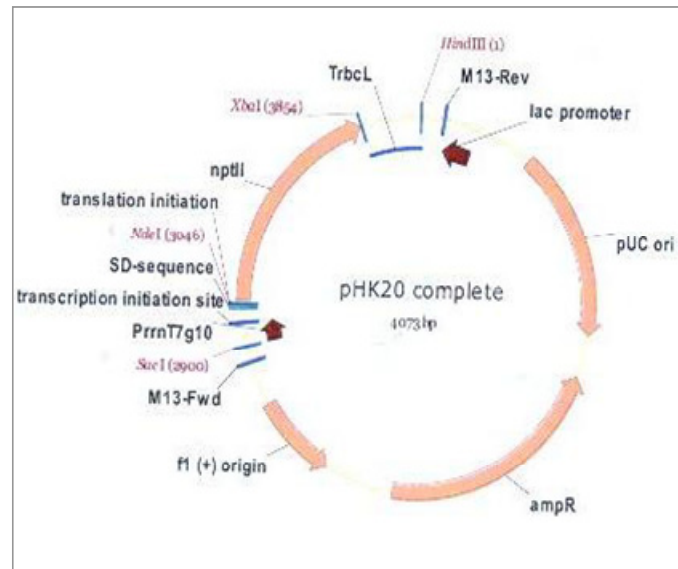


Abb. 9.12. Vektorkarte des Plasmids pHK20. Dieser Subklonierungsvektor enthält eine Expressionskassette, in die das Gen *CYP2A6opt* eingebracht wird.

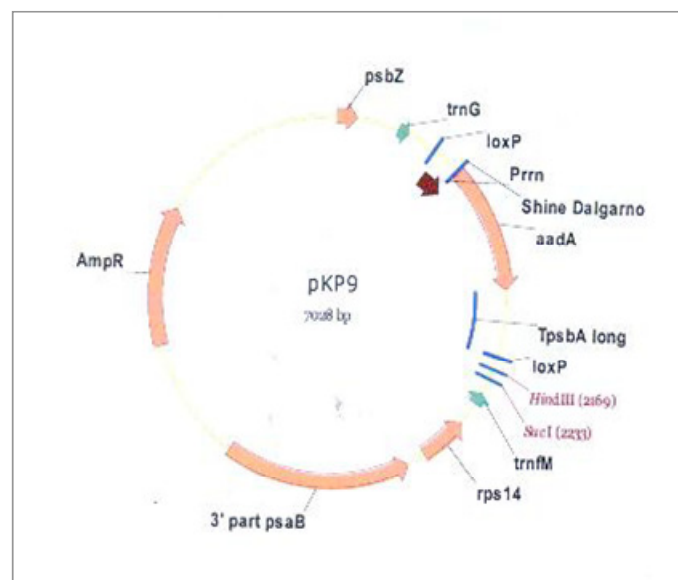


Abb. 9.13. Vektorkarte des Expressionsplasmids pKP9. Die Expression des Transgens *CYP2A6opt* wird hier durch den Promotor *prn* reguliert.

9.3 Vektorkarten ATR2

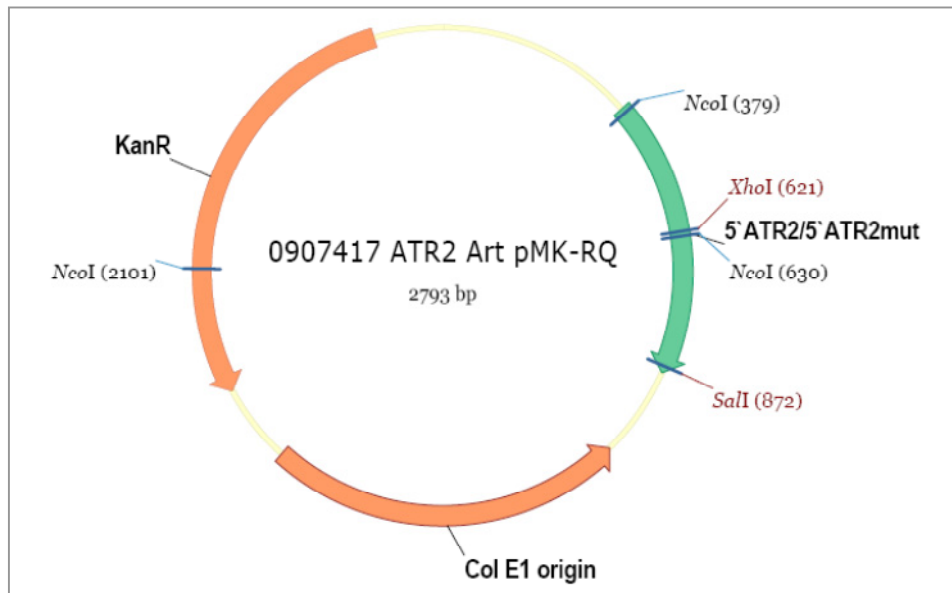


Abb. 9.14. Vektorkarte des Plasmids pMK-RQ-ATR2. Dieses Plasmid wurde von der Firma Mr. Gene bezogen und enthält die Sequenz des 5'ATR2-Bereichs der Reduktase ATR2 sowohl in korrekter als auch mutierter Form.

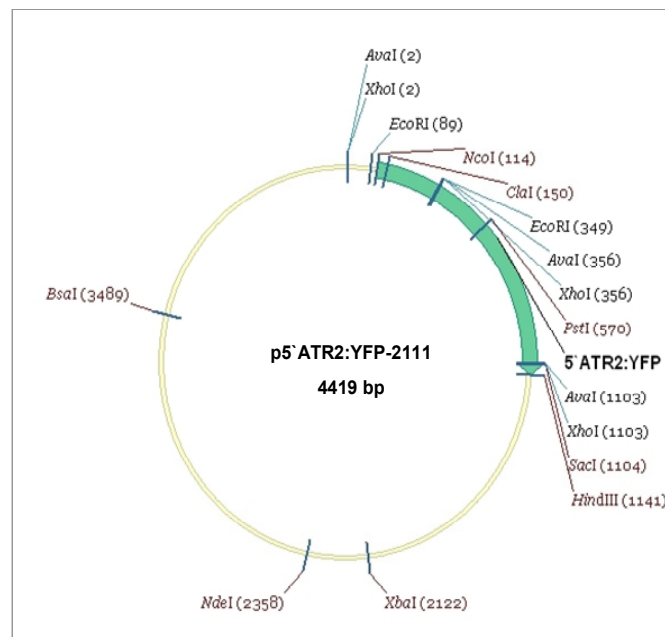


Abb. 9.15. Vektorkarte des bakteriellen Expressionsvektors pQE60.

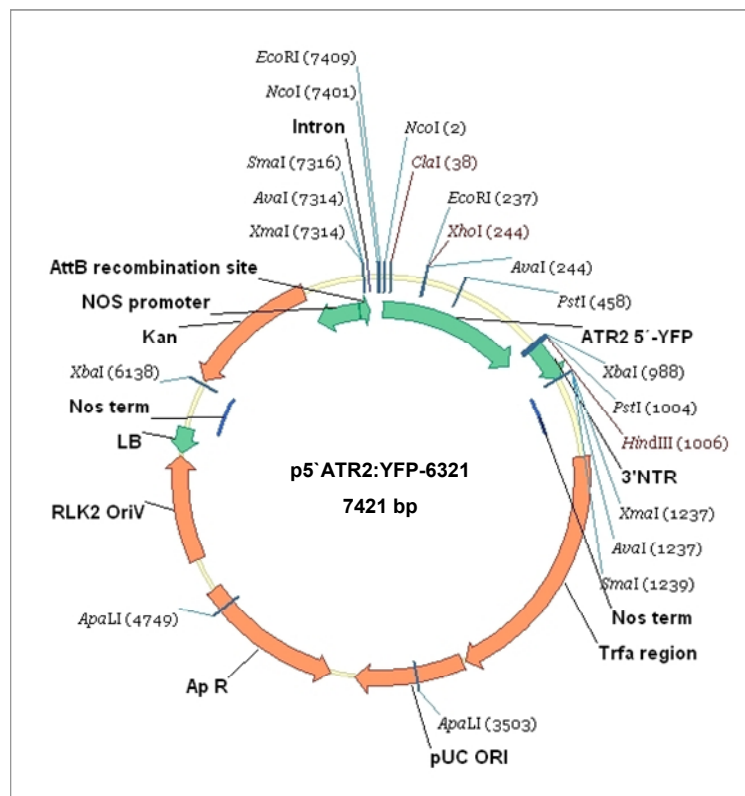


Abb. 9.16. Vektorkarte des ICON-Vektors pICH11599. Dieses 3'-Modul wurde für die transiente Expression der 5' ATR2-Varianten verwendet.

Danksagung

Mein allererster Dank gilt Prof. Dr. Heribert Warzecha, der mir die Möglichkeit gab, mit nach Darmstadt zu kommen und meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich bedanke mich vor allem für die fachliche Betreuung, für viele Ratschläge und seine unermüdliche Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich danke auch Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Außerdem geht ein sehr großer Dank an meine Laborkollegen, insbesondere Simone, Anna und Christine, für die vielen Gespräche, die tolle Laboratmosphäre und die immer wieder unterhaltsamen Abende. Danke auch an die Mitarbeiter der AG Thiel, die in der Mittagspause öfter Zeit für einen Besuch im Keller hatten.

Ich danke auch allen anderen Wissenschaftlern, die durch Beantwortung meiner Fragen oder andere Hilfestellungen jeglicher Art zu dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere danke ich Dr. Tobias Meckel, der mit mir viele dunkle Stunden am CLSM verbracht hat.

Zum Schluss danke ich natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und nie die Geduld mit mir verloren haben.

Lebenslauf

Susan Urbank

Geburtsdatum: 27.12.1982
Geburtsort: Bautzen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Universitätsstudium

Aug. 2007 – Aug. 2011 Promotionsstudium an der TU Darmstadt

Jan. 2007 – Aug. 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Graduiertenkolleg 1342)

Okt. 2001 – Dez. 2006 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Abschluss: Diplom-Biologin

Schulische Ausbildung

1989 – 1993 Pestalozzi-Grundschule Bautzen

1993 – 2001 Philipp-Melanchthon-Gymnasium Bautzen
Abschluss: Abitur

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 09.03.2012

.....

Susan Urbank